

Aus der Klinik für Herz-, Thorax- und Gefäßchirurgie  
Deutsches Herzzentrum Berlin  
(Ärztlicher Direktor: Professor Dr. med. Dr. hc mult. R. Hetzer)

***Tissue Engineering von kardiovaskulären Geweben***

Habilitationsschrift  
zur Erlangung der Venia legendi  
für das Fach Herzchirurgie

an der  
Medizinischen Fakultät  
der  
Humboldt-Universität  
Berlin

vorgelegt von

Dr. med. Ralf Sodian

Berlin 2004

Öffentlich-wissenschaftlicher Vortrag am: 18. April 2005

Gutachter: Prof. Dr. Moosdorf (Universität Marburg)  
Prof. Dr. G. Zünd (Universitätsspital Zürich)  
Prof. Dr. T. Lueth (Charité) (didaktisches Gutachten)

## **Inhaltsverzeichnis:**

<b>1.</b>	<b><u>Einleitung:</u></b>	<b><u>Seite</u></b>
1.1	Allgemeiner Teil	5-10
1.2	Tissue Engineering	
1.2.1	Prinzipien des „Tissue Engineerings“ von kardiovaskulären Geweben	10-13
1.2.2	Potentielle Zellquellen für das „Tissue Engineering“ von kardiovaskulären Geweben	13
1.2.3	Biomaterialien und „Tissue Engineering“	13-14
1.2.4	Bioreaktoren	14-15
1.2.5	„Tissue Engineering“ von Herzklappen – Stand der Technik	15-16
1.2.6	„Tissue Engineering“ von Gefäßen – Stand der Technik	16-17
1.2.7	Myokard – und Zelltransplantation zur Myokardregeneration	17
<b>2.</b>	<b><u>Eigene Arbeiten</u></b>	
2.1	Evaluierung resorbierbarer Polymergerüste für das „Tissue Engineering“ von Herzklappen	18-19
2.2	Herstellung eines Herzklappengerüst für das „Tissue Engineering“	19
2.3	Bioreaktorsystem für die Herstellung von „tissue engineerten“ Herzklappen	20
2.4	<i>In-vitro</i> -Herstellung von „tissue engineerten“ Herzklappen	20
2.5	<i>In-vivo</i> -Ergebnisse von „tissue engineerten“ Herzklappen	21
2.5.1	Ergebnisse mit einem porösen PHOH-Herzklappengerüst	21
2.5.2	<i>In-vivo</i> -Ergebnisse mit einer in-vitro hergestellten Herzklappe	21

	<u>Seite</u>
2.6 Limitationen des bisherigen Konzeptes und potentielle Modifikationsmöglichkeiten	22
2.6.1 Anwendung von stereolithographischen Techniken für die Herstellung von Herzklappengerüsten	22
2.6.2 Modifiziertes Bioreaktorsystem zur Herstellung von klappentragenden Konduits	22-23
2.6.3 Bioreaktorsystem zur Herstellung eines „Patches“	23
2.7 Erste Ergebnisse mit humanen Zellquellen für das Tissue Engineering von kardiovaskulären Geweben	23
 <b>3. <u>Relevante Originalarbeiten</u></b>	
3.1 Evaluierung von resorbierbaren, dreidimensionalen Polymergerüsten für das „Tissue Engineering“ von Herzklappen	24
3.2 Herstellung eines Herzklappengerüst aus einem Polyhydroxyalkanoid für das „Tissue Engineering“	25
3.3 Entwicklung eines neuartigen Bioreaktorsystems für die in-vitro-Herstellung von „tissue engineerten“ Herzklappen	26
3.4 In-vitro-Herstellung von „tissue engineerten“ Herzklappen	27
3.4.1 „Tissue Engineering“ einer dreisegligen Herzklappe – In-vitro Ergebnisse mit einem kombinierten Polymer (PGA/PHOH)	27
3.4.2 „Tissue Engineering“ von Herzklappen: In-vitro Ergebnisse (poröses PHOH)	27
3.5 In-vivo-Ergebnisse von „tissue engineerten“ Herzklappen	28
3.5.1 Frühe in-vivo Ergebnisse mit einer „tissue engineerten“, dreisegligen Herzklappe	28
3.5.2 In-vivo-Ergebnisse mit einer in-vitro hergestellten Herzklappe	28

	<u>Seite</u>
3.6 Limitationen des bisherigen Konzeptes und potentielle Modifikationsmöglichkeiten	29
3.6.1 Anwendung von stereolithographischen Techniken für die Herstellung von Herzklappengerüsten für das „Tissue Engineering“	29
3.6.2 Kombiniertes Besiedlungs- und Perfusionssystem zur Herstellung von Gefäßen und klappentragenden Konduits	29
3.6.3 Ein neuartiger pulsatiler Bioreaktor zur Herstellung von „tissue engineerten Patches“	29
3.7 Effekte von bFGF und TGFβ auf humane, vaskuläre Zellkulturen für das „Tissue Engineering“ von humanen, kardiovaskulären Geweben	30
 <b>4. <u>Diskussion</u></b>	
4.1 Evaluierung von resorbierbaren Polymergerüsten für das „Tissue Engineering“ von Herzklappen	31-32
4.2 Herstellung eines Herzklappengerüst für das „Tissue Engineering“	32
4.3 Bioreaktorsystem für die Herstellung von „tissue engineerten“ Herzklappen	33
4.4 In-vitro-Herstellung von „tissue engineerten“ Herzklappen	34
4.5 In-vivo-Ergebnisse von „tissue engineerten“ Herzklappen	35-36
4.6 Anwendung von stereolithographischen Techniken für die Herstellung von Herzklappengerüsten	37
4.7 Modifiziertes Bioreaktorsystem ( Konduits )	38
4.8 Bioreaktorsystem zur Herstellung eines „Patches“	39-40
4.9 Erste Ergebnisse mit humanen Zellquellen für das Tissue Engineering von kardiovaskulären Geweben	40-42

	<b><u>Seite</u></b>
<b>5.     <u>Zusammenfassung und Perspektive</u></b>	43-44
<b>6.     <u>Terminologie</u></b>	
6.1     Tissue Engineering	45
6.2     Polymere	45-47
6.3     Bioreaktor	47
 <b><u>Literaturverzeichnis</u></b>	48-55
 <b><u>Abkürzungsverzeichnis</u></b>	56
 <b><u>Tierversuchsgenehmigung und Ethikantrag</u></b>	57
 <b><u>Danksagung</u></b>	58-59
 <b><u>Eidesstattliche Versicherung</u></b>	60

## **1. Einleitung**

### **1.1 Allgemeiner Teil**

Der Verlust von Organen, der Ersatz sowie die Wiederherstellung der Organfunktionen stellt eine der größten Probleme der modernen Medizin dar. Allein in den USA werden pro Jahr ca. 8 Millionen chirurgische Eingriffe vorgenommen um einen solchen Organverlust zu behandeln. Die dadurch entstehenden Kosten pro Jahr sind hoch und werden auf über 500 Milliarden USD geschätzt. Neben den großen volkswirtschaftlichen Auswirkungen dieser Erkrankungen, ist das Schicksal und der Leidensweg jedes einzelnen Patienten immens (1).

Die Idee den Verlust von Gewebe zu ersetzen, wurde erstmals von Tagliacozzi of Bologna (Italien) in „De Custorum Chirurgica per Insitionem“ entwickelt. In diesem frühen Report wird der Ersatz einer Nase beschrieben (2). Bis zum heutigen Tage haben die Entwicklungen bei den chirurgischen Techniken, der Anästhesie, der Sterilität, der Pharmazie und den prothetischen Materialien dazu geführt, daß es in den meisten Fällen möglich ist, den Verlust eines Organs oder einer Gewebestruktur erfolgreich zu ersetzen. Hierbei ist die Transplantation von ganzen Organen von besonderer Bedeutung und als einen herausragenden Meilenstein der Medizin der vergangenen 50 Jahre zu sehen, welcher tausenden von Patienten das Leben retten konnte. Hierbei war die Forschung auf den Gebieten der Transplantationsbiologie und der Immunologie entscheidend für die aktuellen Erfolge der Transplantationsmedizin. Vor allem hat die Entwicklung von speziellen Immunsuppressiva dazu geführt, daß es zum heutigen Zeitpunkt unter anderem möglich ist Niere, Leber, Herz, Lunge und Pankreas weltweit in hunderten von Zentren zu transplantieren (3, 4, 5).

Trotz der großen Bedeutung der Transplantation für die moderne Medizin gibt es auch einige schwerwiegende Probleme. Eine der größten Limitationen der Organtransplantation ist die weltweit bestehende Organknappheit. Aufgrund der beschränkten Organangebote werden die Anzahl der auf den Wartelisten befindlichen Patienten immer größer und damit die Wartezeiten immer länger. Bei einigen Patienten verschlechtert sich die Organfunktion kontinuierlich und muß durch künstliche Unterstützungssysteme (z.B. mechanische Kreislaufunterstützungssysteme) bis zur Transplantation aufrechterhalten werden oder die Patienten versterben bevor ein passendes Organ gefunden werden konnte (6). Weiterhin ist eine lebenslange Immunsuppression nach einer Organtransplantation notwendig, da es

## Einleitung

ansonsten zu lebensgefährlichen Abstoßungsreaktionen kommen könnte. Andererseits jedoch begünstigt eine medikamentöse Dauerimmunsuppression die Entstehung von Tumoren, Infektionen und sekundären, toxischen Organschäden (z.B. Nephropathie bei Cyclosporin), welche ebenfalls die Lebensqualität und die Lebensdauer der Patienten signifikant beeinflusst (7, 8).

Ein weitere Patientengruppe, die in den vergangenen 50 Jahren ebenfalls enorm durch den medizinischen Fortschritt profitiert hat, sind Patienten mit angeborenen Herzfehlern. Hierbei war hauptsächlich die Erfindung der Herz-Lungen-Maschine ausschlaggebend, mit der man angeborene Herzfehler erstmals chirurgisch behandeln konnte. Seit diesem Zeitpunkt wurden die chirurgischen Techniken, das perioperative Management, die medikamentöse Therapie, sowie die diagnostischen Methoden deutlich weiterentwickelt, so das heutzutage komplexe Vitien erfolgreich behandelt werden können. Ein Problem stellt hierbei immer noch der Ersatz von erkrankten oder fehlgebildeten Gewebestrukturen, wie z.B. Herzklappen, Gefäßen, oder Gefäßanteilen dar (9).

Beim Ersatz von Herzklappen werden heutzutage weltweit drei verschiedene Klappentypen klinisch angewandt. Hierbei handelt es sich um glutaraldehydfixierte Xenografts (Prothesen, deren Segel aus tierischem Material besteht), mechanische Klappenprothesen (heute zumeist aus Pyrolithkohlenstoff) oder Homografts (menschliche Herzklappen von Verstorbenen oder von entnommenen Herzen von Patienten mit Herztransplantation und von Organspendern, deren Herz als ganzes nicht zur Transplantation geeignet ist). Während die hämodynamischen Funktionen dieser Prothesen befriedigend sind, gibt es jedoch einige spezifische Limitationen bei jeder einzelnen dieser Prothesenarten, welche alle mit charakteristischen Komplikationen und Einschränkungen für die Patienten verbunden sind.

Seit Beginn der eigentlichen Herzklappenersatzchirurgie (1960) haben sich die mechanischen Klappenprothesen in Bezug auf ihre Haltbarkeit und Funktion kontinuierlich verbessert, jedoch sind auch heutzutage alle Prothesen thrombogen (Neigung Blutgerinsel auf der Klappenoberfläche zu induzieren) und eine lebenslängliche Antikoagulation (Medikamente, welche die Blutgerinnungsfähigkeit herabsetzen) ist notwendig. Die Antikoagulation reduziert, jedoch eliminiert nicht das Risiko der Klappenthrombose und die Embolisation von thrombotischem Material. Sie erhöht aber auch das Blutungsrisiko für die betroffenen Patienten (10, 11).



## Einleitung

Biologische Klappenprothesen (Xenografts) sind weniger thrombogen und benötigen keine Langzeitantikoagulation, jedoch ist ihre Haltbarkeit deutlich geringer. Speziell bei Kindern und jungen Erwachsenen kann man eine stark beschleunigte Degeneration beobachten, die einen erneuten Klappenersatz notwendig macht (12).

Homografts haben wie alle anderen Prothesen Vor- und Nachteile. Ein Hauptnachteil von Homografts ist, daß sie nur in sehr limitierter Anzahl und Größe verfügbar sind. Bei Kindern konnte eine immunologische Reaktion auf die homologen Prothesen in eigenen Studien nachgewiesen werden (13).



Abbildung 1: Verschiedene Typen von Herzklappen a) Beispiel für Xenograft (a) Hancock Herzklappe und b) Homograft (Aortenposition) c) Beispiel für eine mechanische Herzklappe (St. Jude Medical)

Alle verwendeten Klappenprothesen haben jedoch gemeinsam, daß sie für den einzelnen Patienten aus fremden Material bestehen, welche neben einer beschränkten Haltbarkeit auch ein signifikantes Infektionsrisiko sowie ein fehlendes Wachstums- und Regenerationspotential haben. Dies ist ein großer Nachteil bei Kindern und jungen Erwachsenen, die aus ihrer Herzklappenprothese „herauswachsen“ und sich im Laufe ihres Lebens möglicherweise mehrfach einer Korrekturoperation unterziehen müssen (14, 15, 16).

Zum heutigen Zeitpunkt existiert daher keine ideale Herzklappenprothese, welche nicht anikoaguliert werden müßte, resistent gegenüber Infektionen wäre, sich in das umgebende Gewebe integriert, mitwächst und letztendlich eine gute hämodynamische Funktion hätte. Besonders evident jedoch ist der Mangel an geeigneten Klappen, Konduits und Gefäßen bei

## Einleitung

Korrekturoperationen angeborener Herzfehler (z.B. fehlende oder mißgebildete Pulmonalklappen). In diesen Fällen behilft man sich mit kleinkalibrigen, klappentragenden Homografts oder Xenografts, wobei man eine rasche Degeneration und die Notwendigkeit einer wiederholten Operation bewußt in Kauf nehmen muß. Dieser, seit vielen Jahren beklagte Mangel, bedeutet eine enorme psychische und auch körperliche Belastung der Kinder und der Familien. Ein möglicher Ansatz zur Lösung dieses leidvollen Problems könnte durch das Tissue Engineering von Herzklappen und klappentragenden Konduits erreicht werden.

Tabelle 1: Vor – und Nachteile der aktuell verwendeter Klappen, sowie theoretische Vor- und Nachteile von „tissue engineerten“ Herzklappen

<b>Prothesentyp</b>	<b>Vorteile</b>	<b>Nachteile</b>
<b>glutaraldehydfixierte Xenografts</b>	keine Antikoagulation hohe Biokompatibilität	Fremdkörper kein Wachstumspotential Kalzifizierung, Degeneration limitierte Haltbarkeit
<b>mechanische Klappen</b>	lange Haltbarkeit	Fremdkörper kein Wachstumspotential lebenslange Antikoagulation thrombembolische Komplikationen Blutungskomplikationen
<b>Homografts</b>	relative Resistenz gegenüber Infektionen hohe Biokompatibilität	Fremdkörper kein Wachstumspotential begrenzte Verfügbarkeit Antigenität Degeneration und limitierte Haltbarkeit
<b>„Tissue engineerte“ Herzklappen</b>	autologes Gewebe lebendiges Gewebe Wachstumspotential hohe Biokompatibilität verlängerte Haltbarkeit keine Antikoagulation	Herstellung dauert 6-8 Wochen Langzeitverhalten ist unbekannt

## Einleitung

Ein ähnliche Situation zeigt sich bei dem Ersatz oder der Rekonstruktion von Gefäßen. Hier ist der chirurgische Ersatz von Gefäßanteilen oder Bypasses die häufigste Behandlungsform bei atherosklerotisch veränderten Gefäßen und angeborenen Herz- und Gefäßanomalien. Insgesamt werden alle chirurgischen Interventionen an Gefäßen allein in den USA auf über 550.000 Eingriffe pro Jahr geschätzt (17). Bei diesen Eingriffen werden heutzutage hauptsächlich synthetische Prothesen (z.B. Dacron) beim Ersatz von großlumigen Gefäßen (z.B. Bauchaorta) mit befriedigenden Ergebnissen verwendet (18). Weiterhin werden autologe Venensegmente (Bypass-Chirurgie) und Arterien (A.mamaria, A. radialis) zur Revaskularisation von kleineren Gefäßen (z.B. Koronargefäße) bevorzugt gebraucht. Diese sind jedoch nicht immer verfügbar und kleinlumige, synthetische Prothesen haben ein erhöhtes Risiko zu thrombosieren und daher eine deutlich reduzierte Offenheitsrate (19). Die Verwendung von herkömmlichen Gefäßprothesen bei pädiatrischen Patienten mit angeborenen Herz- und Gefäßanomalien ist ebenfalls problematisch, da diese Prothesen nicht mitwachsen können und zu einem späteren Zeitpunkt ausgetauscht werden müssen. Weiterhin zeigt sich bei jungen Patienten ein erhöhtes Risiko einer überschießenden Pseudointimabildung, was zu einer Einengung der Prothese führt (20). Ein solcher Gefäßersatz muß ebenfalls frühzeitig ausgewechselt werden. Von daher sollte der ideale Gefäßersatz ausreichende mechanische Eigenschaften haben, keine thromboembolischen Komplikationen verursachen, sich in das umgebende Gewebe integrieren und letztendlich auch mitwachsen können. Eine potentielle Lösung dieses Problems könnte das Tissue Engineering von autologen Gefäßprothesen bieten (21).

## 1.2 Tissue Engineering

### 1.2.1 Prinzipien des „Tissue Engineerings“ von kardiovaskulären Geweben

Beim „Tissue Engineering“ von kardiovaskulären Strukturen werden Erkenntnisse aus der Medizin, Biologie, Zellbiologie, Chemie usw. mit Methoden der Ingenieurwissenschaften kombiniert, um biologische Ersatzgewebe herzustellen. Das grundsätzliche Konzept dieses Entwicklungsfeldes besteht darin, aus körpereigenen Zellen einen vitalen und funktionalen Gewebe- und Organersatz zu fertigen (22, 23). Hierbei werden autologe (körpereigene) Zellen verwendet, um biologische Gewebe herzustellen, die erkrankte oder zerstörte Organe und Gewebe ersetzen sollen. Die für das Tissue Engineering verwendeten Zellen können wie bei

## Einleitung

unserem Projekt vom Patienten selbst (autolog), aber grundsätzlich auch von einem menschlichen Spender (homolog) oder von einem tierischen Organismus (xenogen) stammen (24). Die isolierten Zellen können vor einer Implantation entsprechend konditioniert werden, damit ein funktionelles Gewebekonstrukt implantiert werden kann (Abbildung 2). In der kurzen Zeit von etwa 10 Jahren, in der das Forschungsfeld „Tissue Engineering“ besteht, haben sich drei verschiedene Strategien etabliert

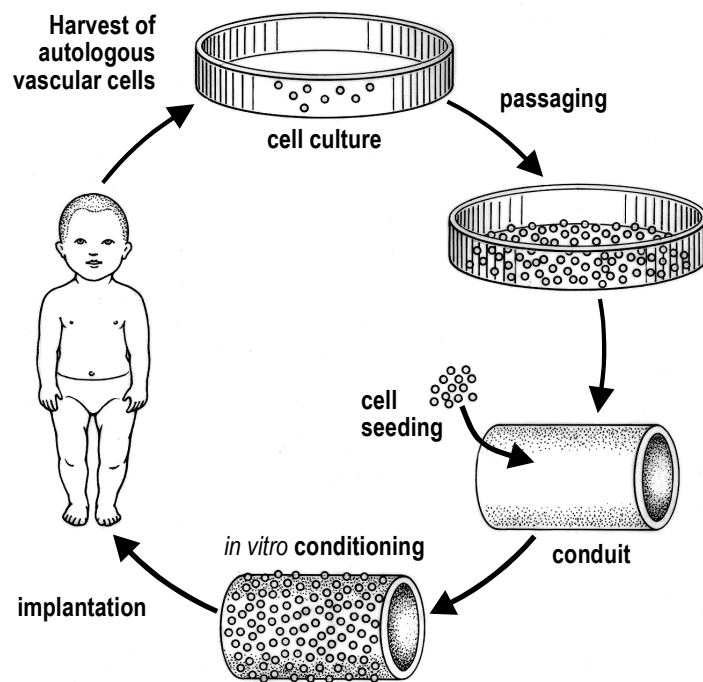


Abbildung 2 zeigt das grundsätzliche Konzept des Tissue Engineerings

### 1. Zellinjektion

Bei dieser Methode versucht man, die zu transplantierenden Zellen über die Blutbahn oder in das entsprechende Organ des Empfängers direkt zu injizieren. Diese Methode eröffnet neue Möglichkeiten, um beispielsweise metabolisch aktive Organe (z.B. Leber) mit entsprechenden Zellen zu unterstützen. Eine der Hauptlimitationen dieser Technik liegt darin, daß man keine großen Mengen von Zellen, wie sie beispielsweise bei einem Organversagen benötigt würden, injizieren kann. Weiterhin ist diese Methode für funktionelle Strukturgewebe wie Knochen, Knorpel oder Herzklappen ungeeignet (25).

## Einleitung

### 2. Geschlossene Systeme

Bei dieser Methode sind die Zellen oder das Gewebe durch eine semipermeable Membran vom umgebenden körpereigenen Strukturen getrennt. Diese Membran erlaubt die Diffusion von Zellprodukten (z.B. Antikörper, Stoffwechselprodukte wie Insulin) und kann somit zumindest teilweise bestimmte Organfunktionen übernehmen. Es wird daran gearbeitet, daß solche extrakorporalen Unterstützungssysteme komplett implantierbar werden (26).

So konnten die ersten Patienten mit extrakorporalen Leberunterstützungssystemen, bei denen xenogene Leberzellen die Funktion der humanen Leber übernehmen, für einige Tage erfolgreich behandelt werden (flow-through designs) (27). Diese Systeme sind jedoch keine Dauerlösung und dienen lediglich zur Überbrückung bis zur Transplantation. Bei implantierbaren Systemen (encapsulation systems) werden sekretorische Zellen in eine semipermeable Membran (macro-und microencapsulation systems) eingehüllt und können so selbst am Leben erhalten werden und gleichzeitig über die Membran Stoffwechselprodukte sezernieren. Diese Technik konnte bei Erkrankungen wie der Parkinson'schen Krankheit (dopaminproduzierende Zellen) oder Diabetes mellitus (insulinproduzierende Zellen) im Tiermodell erfolgreich untersucht werden (28, 29).

Problematisch bei diesem Konzept ist, daß die Konstrukte mit fibrösem Gewebe überwuchert werden und somit ihre Funktionsfähigkeit bisher zeitlich limitiert ist. Das Konzept des geschlossenen Systems eignet sich ebenfalls nicht für das Tissue Engineering von funktionellen Geweben, wie z.B. Herzklappen.

### 3. Offene Systeme

Hierbei handelt es sich um Systeme, die im direkten Kontakt zum umgebenden Gewebe stehen. Basierend auf der Beobachtung, daß isolierte Zellen in der Lage sind, außerhalb des entsprechenden Organs ihre typische Gewebeform und Funktion wiedereinzunehmen, hat man Zellen isoliert und z. B. auf resorbierbaren Polymergerüsten oder anderen biologischen Matrices (z.B. Kollagen oder dezellularisierte Xenografts) angesiedelt. Diese Gerüste werden benötigt, um größeren und komplexeren Geweben (Ohr, Klappe, Gefäß) die entsprechende Form und die benötigten mechanischen Eigenschaften zu verleihen. Während sich eine durch

## Einleitung

die Zellen induzierte extrazelluläre Matrix bildet, die für Stabilität sorgt, sollte sich das Polymergerüst idealerweise im gleichen Maße resorbieren. Bisher konnte dieses Konzept bei Geweben wie Haut, Knochen, Knorpel, Gefäßen, Klappensegel, Herzklappen, Darm, Leber und zahlreichen anderen Geweben experimentell erfolgreich angewendet werden (30, 31, 32).

### 1.2.2 Potentielle Zellquellen für das „Tissue Engineering“ von kardiovaskulären Geweben

Eine der entscheidenden Faktoren für die Auswahl der Zellquelle ist die Eigenschaft der verwendeten Zellen, sich in das gewünschte Gewebe differenzieren zu können. Weiterhin sollten diese Zellen eine hohe Proliferationsrate haben, um in ausreichender Menge für die Gerüstbesiedlung zur Verfügung zu stehen. Bei den meisten Tissue Engineering–Ansätzen handelt es sich um autologe Zellen, prinzipiell könnten jedoch auch homologe oder xenogene Zellen verwendet werden. Aktuell wird in verschiedenen Experimenten mit folgenden Zellquellen gearbeitet: differenzierte Zellen (z.B. Endothelzellen), gewebespezifische, adulte Stammzellen, Knochenmarkszellen, im Blut zirkulierende Vorläuferzellen und pluripotente, embryonale Stammzellen.

Für jede einzelne Zellquelle gibt es erste vielversprechende Ergebnisse, allerdings haben alle Ansätze auch spezifische Vor- und Nachteile, welche für das Tissue Engineering von kardiovaskulären Geweben in zukünftigen Experimenten evaluiert werden müssen (33, 34, 35, 36).

### 1.2.3 Biomaterialien und „Tissue Engineering“

Der Ursprung des Forschungsfeldes Tissue Engineering liegt in der Entwicklung der Zell- und Molekularbiologie und der Erforschung von Biomaterialien und ihrer Interaktion mit biologischen Systemen. Bei der Entwicklung von chirurgisch anwendbaren Prothesen und Biomaterialien unterscheidet man daher drei Phasen (37):

Bei Biomaterialien der ersten Phase kam es darauf an, daß man eine Prothese implantieren konnte, welche die funktionellen Eigenschaften des zu ersetzenden Gewebes erfüllt und ohne größeren Fremdkörperreaktionen implantiert werden konnte. Meist wurden diese Materialien nicht speziell für die medizinische Anwendung entwickelt, jedoch aufgrund ihrer

## Einleitung

physikalischen Eigenschaften und ihrer Verträglichkeit in biologischen Systemen als Prothesenmaterial ausgewählt. Die Entwicklung solcher Biomaterialien begann in den 50er Jahren und Beispiele hierfür wären Silikon (Implantate, Schlauchsysteme usw.), Carbon (mechanische Herzklappen) oder Dacron (Gefäßprothesen). Die Wechselwirkungen dieser Materialien mit dem menschlichen Organismus wurden vielfach untersucht und werden weiterhin optimiert (38, 39).

Überlappend zu dieser Entwicklung wurden sogenannte „bioaktive“ Materialien erforscht, welche die Haupteigenschaft haben, eine Interaktion mit dem menschlichen Organismus einzugehen. Die Ära dieser Materialien begann in den 70er Jahren und Beispiele dafür wären resorbierbare Nahtmaterialien aus PLA (polylactic acid) und PGA (polyglycolic acid), welche nach einer gewissen Zeit vom Körper abgebaut werden, oder heparinbeschichtete Schlauchsysteme, die eine frühzeitige Thrombenbildung (mechanische Kreislaufunterstützungssystem) verhindern sollen (40).

Die dritte Phase der Biomaterialien ist dadurch charakterisiert, daß sie eine präzise Reaktion in physiologischen Systemen hervorrufen können. Diese Biomaterialien wurden so gefertigt, daß sie auf molekularer Ebene mit Zellen und Proteinen reagieren können. Solche Materialien könnten z.B. mit Zellen besiedelt werden und *in-vitro* oder *in-vivo* spezifische, kontrollierte Reaktionen eingehen. Hierbei ist die Interaktion zwischen den Zellen von entscheidender Bedeutung und kann beeinflußt werden durch Adhäsionsproteine (z.B. Fibronectin, RGD-Peptides usw.) oder Wachstumsfaktoren (z.B. basic fibroblast growth factor (bFGF)), wodurch die Bildung von extrazellulären Matrixproteinen eingeleitet werden. Die Herstellung eines funktionsfähigen, biologischen Ersatzmaterials ist bei diesen Biomaterialien das entscheidende Ziel (41).

### 1.2.4 Bioreaktoren

Mit sogenannten Bioreaktoren werden *in-vitro*-Bedingungen geschaffen, um mit Zellen besiedelte Gerüste zu vitalem, dreidimensionalen Gewebe heranreifen zu lassen. In diesen Systemen werden *in-vivo*-Bedingungen künstlich nachgeahmt und die Konstrukte werden mit Sauerstoff, Wachstumsfaktoren, Zellkulturmedium versorgt und parallel biomechanischen Bedingungen (Fluß, Druck, Dehnung und Kompression) ausgesetzt, die die Gewebekonstruktion



fördern. Hierbei liegt ein besonderer Schwerpunkt auf der Verbesserung der Gewebestruktur und den biomechanischen Eigenschaften des in-vitro hergestellten Gewebekonstrukts. Aktuell werden Bioreaktorsysteme größtenteils als Prototypen für die Herstellung von Herzklappen, Gefäßen, Myokard und nichtkardiovaskulären Geweben (z.B. Knorpel, Knochen und Haut) gefertigt. Es wurde bisher lediglich in experimentellen Arbeiten die Wirksamkeit dieses Konzeptes nachgewiesen (42, 43, 44).

### 1.2.5 „Tissue Engineering“ von Herzklappen – Stand der Technik

In einem ersten Experiment wurde versucht, die kleinste funktionelle Einheit einer Herzklappe, nämlich ein einziges Segel einer ursprünglich dreisegligen Herzklappe zu „tissue engineeren“. In diesem Experiment wurde das in vitro hergestellte Gewebekonstrukt in posteriorer Position der Pulmonalklappe eines Schafes implantiert. Hier wurde ein Versuchsmodell mit niedrigen systolischen und diastolischen Drücken gewählt, da man sich zu diesem Zeitpunkt noch nicht sicher war, ob das Konstrukt systemischen Druck- und Flußverhältnissen standhält. Als Segelgerüst diente ein kombiniertes Polymer-Gerüst aus PLA (polylactic acid), welches beidseitig von einem PGA-Gerüst (polyglycolic acid (92% glycolic und 8% lactic acid)) ummantelt war. Dieses Polymer wurde mit Myofibroblasten und mit Endothelzellen vom gleichen Schaf besiedelt, dem das besiedelte Segelkonstrukt in posteriorer Position der Pulmonalklappe implantiert wurde. Nach elf Wochen in vivo zeigten die „tissue engineeren“ Segelkonstrukte eine gute Funktion und morphologisch glichen sie einem natürlichen Segel. Das Hauptproblem bei diesem Experiment war, daß das PGA/PLA-Gerüst steif wurde und sich verdickt hat. Aus diesem Grunde war es nicht möglich, eine nicht-stenotische dreiseglige Herzklappe aus diesem Material herzustellen (45). Basierend auf diesem Experiment beschäftigt sich meine Forschungsarbeit hauptsächlich mit der Entwicklung einer kompletten, dreisegligen Herzklappe, sowie Patches und Konduits.

Ein weiterer Ansatz beim Tissue Engineering von Herzklappen ist die Verwendung einer dezellularisierten, xenogenen Klappenmatrix, welche mit Spenderzellen besiedelt wird. Bei diesem Konzept besteht der Vorteil, daß man ein nahezu perfektes Klappendesign übernimmt und daher vom Zeitpunkt der Implantation mit guten hämodynamischen Verhältnissen rechnen kann.

Der Nachteil dieser Methode ist, daß vaskuläre Zellen nicht in das Innere des Gerüst migrieren können und es sich bei diesem Gerüstmaterial um eine avitale Struktur handelt, deren Wachstumspotential und Regenerationsfähigkeit bisher nicht geklärt ist. Aktuell werden diese Konstrukte im Tiermodell, sowie bei systemischen Druck- und Flußverhältnissen getestet. In einer ersten Studie an der Universitätsklinik Wien wurden unbesiedelte, dezellularisierte, xenogene Herzklappenmatrices mit fatalen Folgen für die Patienten implantiert. Die Ergebnisse unterstreichen die besondere Wichtigkeit der Zellbesiedelung und adäquaten Gewebeentwicklung bereits vor einer Implantation beim Menschen. Bei diesem Konzept sind daher weitere in vitro- und in vivo- Experimente notwendig, um eine zuverlässige Anwendung in der menschlichen Herzchirurgie zu ermöglichen (46, 47).

### 1.2.6 „Tissue Engineering“ von Gefäßen – Stand der Technik

Im Jahre 1986 wurde erstmals eine Methode von Weinberg und Bell vorgestellt, bei der eine mehrschichtige Gefäßprothese aus Kollagen, Fibroblasten, glatten Muskelzellen und Endothelzellen (vom Rind) gefertigt werden konnte. Obwohl sich diese Konstrukte nicht in einem in-vivo-Modell bewähren konnten, wurde mit dieser Methode eine der ersten vaskulären, tissue engineerten Konstrukte hergestellt (48).

Eine Weiterentwicklung dieser Methode wird 1998 von L'Heureux beschrieben. Hierbei wird ein zusammenhängender Gewebemantel aus glatten Muskelzellen zu einer Gefäßmedia gerollt. Auf diese „Rolle“ von glatten Muskelzellen wurden anschließend humane Fibroblasten auf die Außenfläche (Adventitia) und humane Endothelzellen im Lumen der Gefäßmedia besiedelt. Man erhielt somit eine humane Gefäßprothese, welche intraluminalen Drücken von bis zu 2000 mmHg standhalten konnte (49).

Ein weiterer Ansatz wurde 1999 von Niklason beschrieben. Hierbei wurden PGA-Gerüste zu Gefäßprothesen geformt, welche mit Fibroblasten, glatten Muskelzellen und Endothelzellen besiedelt wurden und anschließend pulsatilen Flüssen in einem eigens entwickelten Bioreaktorsystem ausgesetzt wurden. In diesem Experiment konnte gezeigt werden, daß die im Bioreaktor konditionierten Gefäßprothesen histologisch natürlichem Gefäßgewebe glichen, sowie bessere biomechanische Eigenschaften hatten als nichtkonditionierte Zell-Polymerkonstrukte (50). In einer Weiterentwicklung dieses Ansatzes konnten im Jahre 2001

die ersten tissue engineered Gefäßanteile in Pulmonalisposition beim Menschen implantiert werden (51).

Ebenfalls bereits klinische Anwendung fanden mit Endothelzellen besiedelte ePTFE-Prothesen als Koronarbypässe und periphere Bypässe. In einigen Studien zeigten diese Prothesen gute funktionelle Ergebnisse und waren charakterisiert durch eine Neointima aus glatten Muskelzellen und einer einschichtigen Endothelzellschicht (52).

### 1.2.7 Myokard und Zelltransplantation zur Myokardregeneration

Seit Ende der neunziger Jahre wird in einigen wenigen Forschungsgruppen versucht, funktionelles Myokard per Tissue Engineering *in-vitro* herzustellen. Mit Hilfe der konventionellen Vorgehensweise, nämlich Zellen, ein Gerüst und Bioreaktorsysteme zu verwenden, konnten erste, kontrahierende Myokardanteile *in-vitro* hergestellt werden.

Im Mittelpunkt der Arbeit von Papadaki et al. steht die Verwendung von neonatalen Myokardzellen und die Entwicklung von neuartigen *in-vitro* Systemen. Diese sogenannten Bioreaktoren dienen der Verbesserung der Sauerstoffzufuhr, Nährstoffversorgung und üben parallel physikalische Reize (z.B. Fluß und Dehnung) aus, wodurch ein verwertbares Myokard-Konstrukt entstehen kann. In diesen Arbeiten zeigt sich, dass ein dynamisches Konditionierungskonzept mittels Fluß und minimaler physikalischer Dehnung von Vorteil für eine gleichmäßige Entwicklung von Herzmuskelgewebe ist (53).

Parallel zu dem Ansatz, isolierte Myokard-Konstrukte für eine potentielle Implantation herzustellen, wird von verschiedenen Forschungsgruppen versucht, z.B. autologe Knochenmarksstammzellen zu transplantieren, um eine Myokardregeneration zu fördern. Stamm et al. haben autologe, AC 133-positive Knochenmarkzellen in infarziertes Myokardgewebe injiziert und parallel das entsprechende Koronargefäß mit einem Bypass versorgt. Neun Monate nach diesem Eingriff zeigte sich eine verbesserte linksventrikuläre Funktion, sowie eine gesteigerte Perfusion des infarzierten Myokardanteils. Die Autoren meinen, daß dieser Effekt auf eine durch die AC133-positiven Zellen induzierte Neoangiogenese zurückzuführen ist. Die weitere Evaluierung dieser Methoden wird zukünftig notwendig sein, um eine zuverlässige und reproduzierbare Myokardregeneration zu erreichen (54, 55, 56).

## **2. Eigene Arbeiten**

Ausgangspunkt meiner Arbeit war die Herstellung des ersten „tissue engineerten“ Klappensegels von Shinoka et al. aus dem Jahre 1996. Aufgrund der mechanischen Eigenschaften des verwendeten Polymers war es nicht möglich eine dreiseglige, tissue engineerten Herzklappe herzustellen. Im Anschluß an dieses Experiment war der nächste Schritt, eine funktionsfähige, dreiseglige Herzklappe per Tissue Engineering herzustellen. Um dieses Ziel zu erreichen, mußten neuartige Polymere als Gerüstmaterialien evaluiert werden, sowie optimale *in-vitro*-Bedingungen neu entwickelt werden. In einem nächsten Schritt wurden die entstandenen Konstrukte *in-vitro* als auch *in-vivo* getestet.

Ausgehend von diesen ersten Ergebnissen wurde die Methode weiterentwickelt und auf andere kardiovaskuläre Gewebe wie großlumige Gefäße und Patches ausgeweitet. Parallel zu den Arbeiten mit tierischen Zellen wurde weiterhin versucht, Konstrukte aus humanen Zellen herzustellen.

### **2.1 Evaluierung resorbierbarer Polymergerüste für das „Tissue Engineering“ von Herzklappen**

Das Hauptprinzip des „Tissue Engineerings“ beruht auf der Besiedlung von körpereigenen Zellen auf ein resorbierbares Polymergerüst. Diese Zellen beginnen anschließend, in das Polymer einzuwachsen und ihre eigene extrazelluläre Matrix zu bilden. Im Idealfall sollte sich das Polymergerüst komplett auflösen und ein vitales, körpereigenes Gewebe entstanden sein. Um dieses Prinzip auf die Herstellung einer „tissue engineerten“ Herzklappe anzuwenden, wird eine geeignete dreidimensionale Matrix für die Besiedlung mit Fibroblasten, glatten Muskelzellen und Endothelzellen benötigt. Das Hauptproblem bisheriger Ansätze war, daß das verwendete Gerüstmaterial ungeeignet war für die Herstellung einer dreisegligen Herzklappe. PGA war als Herzklappengerüst zu steif, zu dick und wies eine zu geringe Biegsamkeit auf.

## Eigene Arbeiten

Aus diesem Grunde habe ich zum Beginn meiner Arbeit im Labor von Dr. J.P. Vacanti und Dr. J.E. Mayer jr. versucht neuartige Polymere zu testen, um folgende relevanten Fragen zu beantworten:

- Läßt sich aus den vorhandenen Polymeren ein Herzklappengerüst formen?
- Haben die Polymere ausreichende biomechanische Eigenschaften?
- Kann man vaskuläre Zellen auf diesen Polymeren besiedeln?
- Können diese Zellen auf diesen Polymeren ihre eigene extrazelluläre Matrix bilden?

*(Sodian R, Hoerstrup SP, Sperling JS, Martin DP, Daebritz S, Mayer JE Jr, Vacanti JP. Evaluation of biodegradable, three-dimensional matrices for tissue engineering of heart valves. ASAIO J 2000;46:107-110.)*

## 2.2 Herstellung eines Herzklappengerüst für das „Tissue Engineering“

Bis heute ist die Frage, wie und woraus man ein geeignetes Herzklappengerüst für das Tissue Engineering herstellt, ungeklärt. Da das Polymergerüst sich beim Tissue Engineering von Herzklappen nach Implantation komplett resorbieren soll und das neue Gewebe in der Form des Gerüsts heranwächst, ist das Klappendesign, die Funktionsfähigkeit und die chirurgische Anwendbarkeit des Klappengerüsts von Bedeutung. Zum Zeitpunkt des Experimentes gab es keine veröffentlichte Arbeit, wie ein solches dreisegliges Herzklappengerüst aus Polymeren hergestellt werden könnte.

*(Sodian R, Sperling JS, Martin DP, Egozy A, Stock UA, Mayer Jr JE, Vacanti JP. Fabrication of a trileaflet heart valve scaffold from a polyhydroxyalkanoate biopolyester for use in tissue engineering. Tissue Eng 2000;6:183-188.)*

### 2.3 Bioreaktorsystem für die Herstellung von „tissue engineernten“ Herzklappen

Um funktionsfähiges und vitales Herzklappengewebe in-vitro herzustellen gingen wir davon aus, daß pulsatiler Fluß eine adäquate Gewebeentwicklung induzieren könnte. Daher entwickelten wir ein neuartiges Bioreaktorsystem, welches unter sterilen Zellkulturbedingungen funktionieren sollte.

*(Hoerstrup SP, Sodian R, Sperling JS, Vacanti JP, Mayer JE Jr. New pulsatile bioreactor for in vitro formation of tissue engineered heart valves. Tissue Eng 2000;6:75-79.)*

### 2.4 In-vitro-Herstellung von „tissue engineernten“ Herzklappen

Aus der Kombination der gewonnenen Erkenntnisse wurde in den nachfolgenden Experimenten die erste in-vitro-Herstellung eines tissue engineernten Herzklappenkonstruktes versucht. Es wurden dreiseglige Herzklappengerüste aus einem porösen Polyhydroxyalkanoate (PHA) und in einem zweiten Versuch aus einer Kombination von PGA und PHO gefertigt, mit vaskulären Zellen von Schafen besiedelt und anschließend einem pulsatilen Fluß ausgesetzt, um die Gewebebildung in-vitro zu induzieren. Diese Versuche dienten zum einen dazu, neuartige Polymer für das Tissue Engineering von Herzklappen zu evaluieren, sowie den positiven Einfluß von dynamischen Druck- und Flußbedingungen für die Gewebebildung in-vitro nachzuweisen.

*(Sodian R, Sperling JS, Martin DP, Stock U, Mayer Jr JE, Vacanti JP. Tissue engineering of a trileaflet valve - early in vitro experiences with a combined polymer. Tissue Eng 1999;5:489-493.)*

*(Sodian R, Hoerstrup SP, Sperling JS, Daebritz SH, Martin DP, Schoen FJ, Vacanti JP, Mayer Jr JE. Tissue engineering of heart valves: in vitro experiences. Ann Thorac Surg 2000;70:140-144.)*

## 2.5 *In-vivo*-Ergebnisse von „tissue engineernten“ Herzklappen

### 2.5.1 Ergebnisse mit einem porösen PHOH-Herzklappengerüst

Nachdem sich in den vorbeschriebenen Experimenten gezeigt hat, daß es möglich ist eine funktionsfähige, dreisehlige Herzklappe aus porösem PHA herzustellen und *in-vitro* zu einem vitalen Gewebe-Polymer-Konstrukt zu konditionieren, war der nächste Schritt die Anwendbarkeit dieses Konzeptes in einem ersten Tierexperiment zu überprüfen.

Im nachfolgenden Experiment wurden fünf tissue engineernte Herzklappen in Pulmonalisposition im Schafmodell implantiert. Die vaskulären Zellen für die tissue engineernte Herzklappe entstammten bei diesem Experiment vom gleichen Tier welches nach entsprechender *in-vitro* Konditionierung die Herzklappe erhalten sollte (Schema). Die Funktionsfähigkeit der Herzklappen wurde regelmäßig echokardiographisch kontrolliert. Nach einer *in-vivo* Zeit von 1, 5, 13 und 17 Wochen wurden die Klappen explantiert und anschließend histologisch, biochemisch und biomechanisch untersucht. Als zusätzliche Kontrolle wurde eine unbesiedeltes Herzklappengerüst (poröses PHA) in gleicher Weise implantiert und anschließend untersucht.

*(Sodian R, Hoerstrup S, Sperling JS, Daebritz S, Martin DP, Moran AM, Kim BS, Schoen FJ, Vacanti JP, Mayer Jr JE. Early in vivo experience with tissue-engineered trileaflet heart valves. Circulation 2000;102(Suppl 3):III-22-III-29.)*

### 2.5.2 *In-vivo*-Ergebnisse mit einer *in-vitro* hergestellten Herzklappe

In einer Weiterentwicklung des vorbeschriebenen Experimentes wurden die Herzklappenkonstrukte vor der Implantation in einem pulsatilen Flußsystem konditioniert. Weiterhin wurden die Klappengerüste aus einer Kombination von PGA und einem neuartigen Polymer (Poly-4-Hydroxybutyrate, P4HB) gefertigt.

*(Hoerstrup SP, Sodian R, Daebritz S, Wang J, Bacha EA, Martin DP, Moran AM, Guleserian KJ, Sperling JS, Kaushal S, Vacanti JP, Schoen FJ, Mayer Jr JE. Functional living trileaflet heart valves grown in vitro. Circulation 2000;102(Suppl 3):III-44-III-49.)*

## **2.6 Limitationen des bisherigen Konzeptes und potentielle Modifikationsmöglichkeiten**

### **2.6.1 Anwendung von stereolithographischen Techniken für die Herstellung von Herzklappengerüsten**

Ziel dieser Versuche war es, ein Herzklappengerüst herzustellen, daß der komplexen anatomischen Struktur einer natürlichen, humanen Pulmonal- oder Aortenklappe sehr nahe kommt. Um dies zu erreichen wurde versucht, pulmonale oder aortale Homografts dreidimensional zu rekonstruieren und über stereolithographische Techniken eine Polymerkopie der Homografts anzufertigen. Aufgrund der vermutlich zu langen Resorptionszeit von PHA wurde in diesem Versuch zusätzlich P4HB (kürzere Resorptionszeit) verwendet. Wie zuvor bereits beschrieben, sind beide Polymere biokompatibel und eignen sich für die Ausbildung von vaskulärem Gewebe sowohl *in-vitro* als auch *in-vivo*.

*(Sodian R, Loebe M, Hein A, Martin DP, Hoerstrup SP, Potapov EV, Hausmann H, Lueth T, Hetzer R. Application of stereolithography for scaffold fabrication for tissue engineered heart valves. ASAIO J 2002;48(1):12-16.)*

### **2.6.2 Modifiziertes Bioreaktorsystem zur Herstellung von klappentragenden Konduits**

Zahlreiche andere Forschergruppen konnten ebenfalls den positiven Effekt von dynamischen Zellkulturbedingungen für die Gewebeentwicklung *in-vitro* beobachten. Allerdings bleiben die technischen Voraussetzungen, um aus vaskulären Zellen funktionelle Gewebeformationen herzustellen, ein signifikantes Problem. Um die Limitationen des Konzeptes zu verbessern, haben wir in diesem Experiment ein neuartiges Zellbesiedlungs- und Konditionierungssystem für die Herstellung von Herzklappen und Gefäßen entwickelt. Bei der Zellbesiedlung kam es darauf an, unter sterilen Bedingungen eine optimale Zellverteilung auf den Polymergerüsten zu erreichen. Im Anschluß sollten die Zell-Polymerkonstrukte in ein steriles Konditionierungssystem überführt werden, welches eine optimale Umgebung, sowie die biochemischen als auch biomechanischen Stimuli für das entstehende Gewebe liefern kann. Die meisten Autoren beschreiben den Besiedlungsvorgang und die spätere Konditionierung als zwei verschiedene Prozesse. Bei diesem Konzept muß das besiedelte Konstrukt mit einem hohen Kontaminationsrisiko in ein zweites Konditionierungssystem gebracht werden, welches



insbesondere für die Anwendung beim Menschen fatale Folgen haben könnte. Aus diesem Grunde haben wir versucht ein kombiniertes Besiedlungs- und Konditionierungssystem zu entwickeln, bei dem die Konstrukte vom Zeitpunkt der Sterilisation bis zur Implantation in einem geschlossenen System verweilen. Dies hätte den Vorteil, daß man das Kontaminationsrisiko insbesondere beim Tissue Engineering von humanen, kardiovaskulären Geweben weiter minimieren könnte.

*(Sodian R, Lemke T, Fritsche C, Hoerstrup SP, Fu P, Potapov EV, Hausmann H, Hetzer R. Tissue-engineering bioreactors: a new combined cell-seeding and perfusion system for vascular tissue engineering. Tissue Eng 2002;8(5):863-870.)*

### 2.6.3 Bioreaktorsystem zur Herstellung eines „Patches“

In diesem Experiment haben wir ein Bioreaktorsystem zur in-vitro Konditionierung von kardiovaskulären „Patches“ entwickelt und seine Funktionsfähigkeit nachgewiesen.

*(Sodian R, Lemke T, Loebe M, Hoerstrup SP, Potapov EV, Hausmann H, Meyer R, Hetzer R. New pulsatile bioreactor for fabrication of tissue-engineered patches. J Biomed Mater Res 2001;58(4):401-405.)*

## 2.7 Erste Ergebnisse mit humanen Zellquellen für das „Tissue Engineering“ von kardiovaskulären Geweben

In diesem Experiment haben wir den Einfluß von Wachstumsfaktoren auf humane, vaskuläre Zellkulturen untersucht und ihre Anwendbarkeit für das Tissue Engineering von Herzklappen und Gefäßen evaluiert. Hier wird versucht das bisher nur im Tierexperiment nachgewiesene Tissue Engineering Konzept auf menschliche Gewebe zu übertragen.

*(Fu P, Sodian R, Lüders C, Lemke T, Kraemer L, Hübler M, Weng Y, Hoerstrup SP, Meyer R, Hetzer R. Effects of basic fibroblasts growth factor and transforming growth factor- $\beta$  on maturation of human pediatric aortic cell culture for tissue engineering of cardiovascular structures. ASAIO Journal 2004;50(1):9-14.)*

### **3. Relevante Originalarbeiten**

Nachfolgend sind die relevanten Originalarbeiten aufgeführt.

#### **3.1 Evaluierung von resorbierbaren, dreidimensionalen Polymergerüsten für das „Tissue Engineering“ von Herzklappen**

*(Sodian R, Hoerstrup SP, Sperling JS, Martin DP, Daebritz S, Mayer JE Jr, Vacanti JP. Evaluation of biodegradable, three-dimensional matrices for tissue engineering of heart valves. ASAIO J 2000;46:107-110.)*

### **3.2 Herstellung eines Herzklappengerüst aus einem Polyhydroxyalkanoid für das „Tissue Engineering“**

( **Sodian R**, Sperling JS, Martin DP, Egozy A, Stock UA, Mayer Jr JE, Vacanti JP. *Fabrication of a trileaflet heart valve scaffold from a polyhydroxyalkanoate biopolyester for use in tissue engineering. Tissue Eng* 2000;6:183-188.)

### **3.3 Entwicklung eines neuartigen Bioreaktorsystems für die in-vitro-Herstellung von „tissue engineerten“ Herzklappen**

*(Hoerstrup SP, Sodian R, Sperling JS, Vacanti JP, Mayer JE Jr. New pulsatile bioreactor for in vitro formation of tissue engineered heart valves. Tissue Eng 2000;6:75-79.)*

### 3.4 In-vitro-Herstellung von „tissue engineerten“ Herzklappen

#### 3.4.1 „Tissue Engineering“ einer dreisegligen Herzklappe – In-vitro Ergebnisse mit einem kombinierten Polymer (PGA/PHOH)

*(Sodian R, Sperling JS, Martin DP, Stock U, Mayer Jr JE, Vacanti JP. Tissue engineering of a trileaflet valve - early in vitro experiences with a combined polymer. Tissue Eng 1999;5:489-493.)*

#### 3.4.2 „Tissue Engineering“ von Herzklappen: In-vitro Ergebnisse (poröses PHOH)

*(Sodian R, Hoerstrup SP, Sperling JS, Daebritz SH, Martin DP, Schoen FJ, Vacanti JP, Mayer Jr JE. Tissue engineering of heart valves: in vitro experiences. Ann Thorac Surg 2000;70:140-144.)*

### 3.5 In-vivo-Ergebnisse von „tissue engineerten“ Herzklappen

#### 3.5.1 Frühe in-vivo Ergebnisse mit einer „tissue engineerten“, dreisehligen Herzklappe

*(Sodian R, Hoerstrup S, Sperling JS, Daebritz S, Martin DP, Moran AM, Kim BS, Schoen FJ, Vacanti JP, Mayer Jr JE. Early in vivo experience with tissue-engineered trileaflet heart valves. Circulation 2000;102(Suppl 3):III-22-III-29.)*

#### 3.5.2 In-vivo - Ergebnisse mit einer in-vitro hergestellten Herzklappe

*(Hoerstrup SP, Sodian R, Daebritz S, Wang J, Bacha EA, Martin DP, Moran AM, Guleserian KJ, Sperling JS, Kaushal S, Vacanti JP, Schoen FJ, Mayer Jr JE. Functional living trileaflet heart valves grown in vitro. Circulation 2000;102(Suppl 3):III-44-III-49.)*

### **3.6 Limitationen des bisherigen Konzeptes und potentielle Modifikationsmöglichkeiten**

#### **3.6.1 Anwendung von stereolithographischen Techniken für die Herstellung von Herzklappengerüsten für das „Tissue Engineering“**

*(Sodian R, Loebe M, Hein A, Martin DP, Hoerstrup SP, Potapov EV, Hausmann H, Lueth T, Hetzer R. Application of stereolithography for scaffold fabrication for tissue engineered heart valves. ASAIO J 2002;48(1):12-16.)*

#### **3.6.2 Kombiniertes Besiedlungs- und Perfusionssystem zur Herstellung von Gefäßen und klappentragenden Konduits**

*(Sodian R, Lemke T, Fritsche C, Hoerstrup SP, Fu P, Potapov EV, Hausmann H, Hetzer R. Tissue-engineering bioreactors: a new combined cell-seeding and perfusion system for vascular tissue engineering. Tissue Eng 2002;8(5):863-870.)*

#### **3.6.3 Ein neuartiger pulsatiler Bioreaktor zur Herstellung von „tissue engineerten Patches“**

*(Sodian R, Lemke T, Loebe M, Hoerstrup SP, Potapov EV, Hausmann H, Meyer R, Hetzer R. New pulsatile bioreactor for fabrication of tissue-engineered patches. J Biomed Mater Res 2001;58(4):401-405.)*

### **3.7 Effekte von bFGF und TGF $\beta$ auf humane, vaskuläre Zellkulturen für das „Tissue Engineering“ von humanen, kardiovaskulären Geweben**

*(Fu P, **Sodian R**, Lüders C, Lemke T, Kraemer L, Hübler M, Weng Y, Hoerstrup SP, Meyer R, Hetzer R. Effects of basic fibroblasts growth factor and transforming growth factor- $\beta$  on maturation of human pediatric aortic cell culture for tissue engineering of cardiovascular structures. ASAIO Journal 2004;50(1):9-14.)*



## **4. Diskussion**

### **4.1 Evaluierung von resorbierbaren Polymergerüsten für das „Tissue Engineering“ von Herzklappen**

In unserem Experiment wurden drei unterschiedliche Polymere für das Tissue Engineering von Herzklappen evaluiert. Aufgrund der thermoplastischen Eigenschaften von PHA und P4HB war es mit diesen Materialien möglich ein dreisegliges Herzklappengerüst zu modellieren, welches sich in einem pulsatilen Flußsystem synchron öffnen und schließen kann. In diesem Experiment war es aufgrund der mangelnden mechanischen Eigenschaften nicht möglich ein funktionsfähiges Herzklappengerüst aus PGA herzustellen.

Weiterhin zeigte sich in der mechanischen Testung, daß PHA und P4HB ausreichende Eigenschaften für eine chirurgische Anwendung haben. Im Gegensatz dazu war es nicht möglich, das besiedelte und acht Tage inkubierte PGA-Konstrukt zu nähen (Prolene 5x0).

Wie bereits von anderen Forschungsgruppen erwähnt, besteht allerdings die Möglichkeit die extrazelluläre Matrixbildung und damit die mechanische Belastbarkeit durch dynamische Zellkulturbedingungen („Shearstress“ und Wachstumsfaktoren) signifikant zu steigern (57, 58). Dies ist eine Möglichkeit, die wir in den nachfolgend beschriebenen Experimenten ebenfalls genutzt und weiterentwickelt haben.

In der biochemischen Untersuchung der besiedelten Polymere fanden sich signifikant mehr Zellen und auch eine höhere Kollagensynthese in den PGA-Konstrukten im Vergleich zu PHA- und P4HB-Konstrukten. Eine Erklärung für dieses Ergebnis könnte die deutlich höhere Porosität (> 90%) und die damit verbunden größere Oberfläche des Polymers sein, welches mit dementsprechend mehr Zellen besiedelt werden kann.

Die Ergebnisse der Elektronenmikroskopie sind in Übereinkunft mit den biochemischen Untersuchungen zu sehen. Auf den elektronenmikroskopischen Aufnahmen erkennt man, daß die Zellen an allen Polymergerüsten anhaften und beginnen, extrazelluläre Matrix zu bilden. Sowohl bei den PHA- als auch bei den P4HB-Konstrukten zeigt sich eine konfluente und glatte Gewebsschicht an der Oberfläche der Konstrukte. Bei den PGA-Konstrukten unterschied sich die Oberfläche in sofern, daß die Zellen an den einzelnen Fasern anhaften

und beginnen, die Faserzwischenräume mit extrazellulärer Matrix auszufüllen. Hier bedarf es unter Umständen einer längeren Inkubationszeit, bis die komplette Oberfläche als konfluentes Gewebe zu erkennen ist. Diese elektronenmikroskopische Beobachtung könnte auch den signifikant höheren Kollagengehalt der PGA-Konstrukte erklären.

Zusammenfassend lassen die Ergebnisse dieses Experimentes den Schluß zu, daß PGA-Konstrukte zwar eine signifikant höhere Gewebebildung aufwiesen, allerdings war ebenfalls sowohl bei PHA- als auch P4HB-Konstrukten eine beträchtliche Zellzahl als auch Kollagensynthese nachweisbar. Ein entscheidender Vorteil für das Tissue Engineering von Herzklappen ist allerdings, daß sich aus PHA und P4HB Herzklappengerüste herstellen ließen, die physiologischen Fluß- und Druckverhältnissen standhalten können und somit für eine potentielle Implantation in Frage kommen könnten.

### **4.2 Herstellung eines Herzklappengerüst für das „Tissue Engineering“**

Im Vergleich zu den vorangegangenen Versuchen mit PGA von Shinoka et al. (59) wies zu diesem Zeitpunkt (1998) PHA einige entscheidende Vorteile für das Tissue Engineering von Herzklappen auf. Ein Vorteil war, daß aufgrund der thermoplastischen Eigenschaften des Materials, ein komplettes dreisegliges Herzklappengerüst aus lediglich einem Material hergestellt werden konnte. Hierfür wurde kein Nahtmaterial oder weitere Polymere gebraucht, welche in parallel durchgeführten Versuchen zu thromboembolischen Komplikationen geführt haben (60). Weiterhin handelte es sich bei den Gerüsten um funktionsfähige Herzklappen, die bei physiologischen Flüssen synchron öffnen und schließen, wie sich im pulsatilen Bioreaktorsystem nachweisen ließ. In unserem Experiment konnte gezeigt werden, daß vaskuläre Zellen auf dem Polymer anhaften, in die poröse Struktur einwachsen und nach kurzer Inkubationszeit nahezu konfluente Gewebe bilden können.

Zusammenfassend läßt sich daher sagen, daß es mit dieser Herstellungstechnik und dem verwendeten porösen PHA möglich sein könnte, ein funktionsfähiges, dreisegliges Herzklappengerüst für das Tissue Engineering von Herzklappen zu fertigen.

#### 4.3 Bioreaktorsystem für die Herstellung von „tissue engineerter“ Herzklappen

Bis zum heutigen Tage sind die Bedingungen, unter denen *in vitro* eine tissue engierte Herzklappe hergestellt wird, unklar. Bei der Entwicklung des neuartigen Bioreaktorsystems sind wir davon ausgegangen, daß pulsatile Flußverhältnisse unter Umständen einen positiven Effekt auf die Ausbildung von Herzklappengewebe haben könnten (61). Zu diesem Zeitpunkt war in der Literatur keine Arbeit beschrieben, die für das Tissue Engineering von Herzklappen ein pulsatile Flußsystem verwendet. Allerdings wurde in einigen bereits publizierten Arbeiten der positive Effekt einer dynamischen Zellkultur für das Tissue Engineering von vaskulären Geweben dokumentiert (62, 63, 64). Es existierte somit kein kommerziell erhältliches System und wir waren daher gezwungen, einen ersten Prototypen selbst zu entwerfen. Dabei bestand die Hauptidee darin, einen Bioreaktor zu entwickeln, in dem es möglich ist, funktionelle Gewebe zu generieren während sich das Polymergerüst kontinuierlich resorbiert. Dieses System war nach unserer Arbeitshypothese die Grundvoraussetzung um Herzklappengewebe *in-vitro* herstellen zu können.

In unserer Arbeit wird erstmals eine technische Beschreibung geliefert wie ein solcher Herzklappen-Bioreaktor aussehen könnte. Das System besteht aus Plexiglas (Kammern), Silikon (Membran) sowie aus Edelstahl (Schrauben und Fixationsringe) und ist einfach zusammenzubauen. Der gesamte Bioreaktor-Aufbau ist komplett sterilisierbar um eine kontaminationsfreie Konditionierung des Gewebes zu ermöglichen. Das gesamte System passt in einen handelsüblichen Inkubator und aufgrund der Plexiglaskammern ist es möglich während der gesamten Konditionierungsphase die Gewebeentwicklung oder eine eventuelle Kontamination zu beobachten. Weiterhin sind die Fluß- und Druckverhältnisse in sub- und supraphysiologischen Bereichen einzustellen und somit Gewebekonstrukte nicht nur zu konditionieren sondern auch unter definierten Bedingungen zu testen. Dieses in der Publikation vorgestellte Bioreaktordesign hat sich auch in den Folgeexperimenten bewährt und wird bis zum jetzigen Zeitpunkt regelmäßig angewendet (65, 66, 67, 68, 69).

### 4.4 *In-vitro*-Herstellung von „tissue engineerter“ Herzklappen

In diesen Experimenten konnte gezeigt werden, daß es möglich ist ein dreiseitiges Herzklappengerüst aus porösem und elastischen PHA herzustellen. Dieses konnte mit vaskulären Zellen besiedelt werden und anschließend in einem pulsatilen Flußsystem zu einem vaskulären Gefäß-Polymer-Konstrukt konditioniert werden. Alle Herzklappengerüste zeigten eine gute Funktion bei sub- und supraphysiologischen Fluß- und Druckverhältnissen. Bei diesen Experimenten wurden poröse Polymere verwendet, um die Oberfläche des Gerüsts zu erhöhen, damit die maximale Anzahl an Zellen auf dem Herzklappengerüst anhaften kann. Weiterhin ist die poröse Struktur des Polymers von großer Bedeutung, da die Zellen in das Gerüst einwachsen, dieses dann komplett zellulär durchbauen und eine Vaskularisierung *in-vivo* ermöglichen.

Beim ersten Experiment konnte gezeigt werden, daß sich vaskuläre Zellen bei kontinuierlicher Flußexposition ausrichten und vermehrt extrazelluläre Matrix bilden. Parallel zu unseren Experimenten konnten Niklason et al ebenfalls den positiven Effekt von kontinuierlichem, pulsatilen Fluß auf die Ausbildung einer extrazellulären Matrix *in-vitro* nachweisen (70). Diese Beobachtungen unterstützen die Annahme, daß kontrollierte, dynamische Zellkulturbedingungen von entscheidender Bedeutung für eine kontrollierte Gewebeentwicklung außerhalb des menschlichen Körpers sind.

Unsere Ergebnisse des zweiten Experimentes zeigten außerdem, daß vaskuläre Zellen an dem porösen PHA-Gerüst anhaften und nach entsprechender Flußexposition eine konfluente, in Flußrichtung ausgerichtete Gewebeschicht ausbilden. Weiterhin konnten wir das einwachsen der Zellen in das Polymer und die gesteigerte Proliferation der Zellen (DNA-Assay) demonstrieren. Die eingewachsenen und proliferierenden vaskulären Zellen waren darüber hinaus in der Lage extrazelluläre Matrixproteine wie Kollagen (4-Hydroxyprolin-Assay, Movat-Staining) und Glycosaminoglykane (Movat-Staining) zu bilden. Eine mögliche Limitation der Methode könnte die fehlende Elastinbildung sein, die in unseren Proben nicht nachgewiesen werden konnte.

Zusammenfassend kann man sagen, daß wir ein erstes vitales Herzklappenkonstrukt *in-vitro* hergestellt haben, welches unter physiologischen Fluß- und Druckverhältnissen funktionsfähig ist.

### 4.5 *In-vivo*-Ergebnisse von „tissue engineerter“ Herzklappen

Nachdem wir in zahlreichen Vorversuchen ein geeignetes Polymer für die Herstellung eines Herzklappengerüsts evaluiert haben und zusätzlich die Bildung von vaskulärem Gewebe *in-vitro* nachweisen konnten, haben wir in diesen Experimenten die *in-vivo*-Eigenschaften der Konstrukte untersucht.

Im ersten Experiment wurde ein poröser Film eines Polyhydroxalkanoids als Polymer für das Herzklappengerüst verwendet und mit einer eigens entwickelten Technik zu einem klappentragenden Konduit modelliert. Die porösen Herzklappengerüste wurden mit vaskulären Zellen von ca. 6 Wochen alten Schafen besiedelt und in das gleiche Tier von dem die Zellen abstammen in supra-valvulärer Pulmonalisposition implantiert. In dieser Studie überlebten alle Tiere das Experiment ohne Komplikationen und entwickelten sich wie gleichaltrige Tiere. In unserem Experiment zeigt sich parallel zum Wachstum der Tiere auch eine Zunahme der Länge und des inneren Durchmessers der "tissue engineerter" Herzklappen. Allerdings konnten man hierbei nicht mit Sicherheit sagen, ob es sich um einen altersentsprechenden Wachstumsprozess handelt oder um eine geringgradige Dilatation bzw. Elongation der Konstrukte. Um diese Frage zuverlässig beantworten zu können wäre eine größere Anzahl von Experimenten und ein längerer Nachbeobachtungszeitraum notwendig.

Die Funktion der "tissue engineerter" Herzklappen wurde mittels Echokardiographie und direkter Druckmessung distal und proximal der Konstrukte vor der Explantation ermittelt. Zum ersten Mal zeigten sich funktionsfähige, tissue engineerter Herzklappen mit einem minimalen Gradienten. Obwohl die Tiere nicht antikoaguliert waren, wurde keinerlei Thrombusbildung an allen Herzklappen (sowohl zellbesiedelt als auch unbesiedelt) oder gar andere thromboembolischen Komplikationen nachgewiesen. Diese Erkenntnis zeigt, daß es sich bei dem Gerüstmaterial um ein biokompatibles Polymer handelt und daß das Design der Herzklappe es ermöglichte, ein funktionsfähiges, tissue engineerter Herzklappenkonstrukt herzustellen. Eine Limitation des Materials war die schlechte Schallbarkeit über eine transthorakale Echokardiographie während des Nachbeobachtungszeitraums.

Alle zellbesiedelten Klappenkonstrukte wiesen neuentstandenes Gewebe auf, welches sowohl makroskopisch, histologisch, elektronenmikroskopisch als auch biochemisch demonstriert werden konnte. Im Gegensatz dazu wurde bei der unbesiedelten Kontrollklappe lediglich einige adhärenz Blutzellen gefunden, jedoch keinerlei Gewebe. Aus diesem Grunde erscheint die Besiedlung mit vaskulären Zellen unerlässlich für die Herstellung eines funktionsfähigen klappentragenden Konduits. Eine sogenannte Autobesiedlung des Polymers mit entweder

zirkulierenden Zellen oder einer Migration der Zellen von den Anastomosenrändern konnte im Gegensatz zu anderen Autoren in unserem Experiment nicht beobachtet werden ( 73, 74, 75 ).

Weiterhin konnte mit diesem Ansatz gezeigt werden, daß es sich bei den explantierten Konstrukten tatsächlich um vitales, vaskularisiertes Gewebe handelt, welches das Polymer komplett bedeckt und in das angrenzende Pulmonalarteriengewebe integriert war. Das Polymer war bereits teilweise resorbiert und in der biomechanischen Testung konnte gezeigt werden, daß das neuentstandene Gewebe die mechanischen Eigenschaften eines nativen Pulmonalgefäßes übernommen hat. Dies war in unserem Experiment eine unerwartete Entwicklung und zeigt die wichtige Bedeutung eines suffizienten „*in-vivo*-Remodelling“ der implantierten Konstrukte.

Obwohl die „tissue engineerten“ Herzklappen eine gute Funktion und auch eine fortgeschrittene Gewebeentwicklung zeigten, konnte keine konfluente Endothelzellschicht in der histologischen Untersuchung der Explantate gefunden werden. Dies könnte eine bedeutende Limitation des Konzeptes sein und die längerfristige Haltbarkeit der „tissue engineerten“ Konstrukte negativ beeinflussen. Ein möglicher Grund für dieses Ergebnis könnte die unter Umständen geringe Anzahl der besiedelten Endothelzellen ( $2 \times 10^6$  Zellen) oder die relativ kurze Inkubationszeit nach der Endothelzellbesiedlung (1 Tag) sein. Dies herauszufinden und zu verbessern sollte in späteren Experimenten untersucht werden.

Zusammenfassend läßt sich aufgrund dieser Ergebnisse sagen, daß es möglich war, eine funktionsfähige, „tissue engineerte“ Herzklappe in Pulmonalisposition eines jungen Schafes zu implantieren. Darüber hinaus konnte in den Nachbeobachtungszeiträumen eine gute Gewebeentwicklung beobachtet werden, die morphologisch, biochemisch und biomechanisch einer nativen Pulmonalarterie sehr nah kam.

Im Folgeexperiment wurden die Herzklappengerüste aus einer Kombination aus PGA und P4HB hergestellt und vor der Implantation in unserem Bioreaktorsystem konditioniert. Das Ergebnis dieses Experimentes zeigt eine Weiterentwicklung des ersten Experimentes und dokumentiert erstmals den positiven Einfluß der präoperativen Gewebekonditionierung für das Tissue Engineering von Herzklappen. Neuartig an diesen Ergebnissen war, daß das Polymergerüst sich vollständig aufgelöst hat und sich statt dessen ein voll funktionsfähiges, autologes Gewebe ausbilden konnte.

#### **4.6 Anwendung von stereolithographischen Techniken für die Herstellung von Herzklappengerüsten**

In meinem Forschungsprojekt werden Polymergerüste als dreidimensionale Matrix für die Herstellung von autologen, kardiovaskulären Geweben verwendet. Beim Tissue Engineering von Herzklappen und Gefäßen kommt dem physiologischen Design der Gerüste aus folgendem Grunde eine besondere Bedeutung zu. Durch die Polymergerüste wird die spätere Form des neugebildeten Gewebes z.B. einer Herzklappe vorgeben und das „tissue engineerte“ Konstrukt sollte auch in dieser Form verbleiben, wenn das Polymer sich resorbiert hat. Dies ist besonders wichtig beim Tissue Engineering von Herzklappen da hier die „Sinus of Valsalva“ eine äußerst wichtige Rolle spielen für die hämodynamische Funktion der Klappe (76, 77). Aus diesem Grund wurde in diesem Experiment versucht, eine Methode zu entwickeln mit der man weitgehend authentische Herzklappengerüste für das Tissue Engineering herstellen kann. Eine Möglichkeit dies zu erreichen war die exakte Rekonstruktion einer humanen Herzklappe mittels „rapid prototyping“ Techniken und speziell entwickelten Fabrikations- bzw. Testungsmethoden.

In unserem Experiment war es möglich, mit einem CT eine Bilddatei zu erstellen, die im Verlauf mit einer speziellen Software dreidimensional rekonstruiert werden konnte, um anschließend ein naturgetreues Stereolithographie-Modell herzustellen. Das entstandene Modell entsprach der komplexen Anatomie eines Homografts und eignete sich zur Herstellung eines Herzklappengerüsts.

Weiterhin wurde eine neuartige Methode beschrieben, wie ein Herzklappengerüst aus lediglich einem resorbierbaren Polymer hergestellt werden kann, ohne Nahtmaterial oder andere Polymere zu verwenden. Die so hergestellten Klappengerüste zeigten eine gute Funktion in der funktionellen Testungsserie unter sub- und supraphysiologischen Bedingungen.

Mit diesem Experiment konnten wir eine wichtige Modifikation des Konzeptes erreichen, indem wir statt zylindrischen Konduits (wie in den zuvor beschriebenen *in-vitro* und *in-vivo* Versuchen) jetzt Herzklappengerüste verwenden können, die der anatomischen Struktur von humanen Herzklappen exakt nachempfunden sind. Wie sich diese Konstrukte in Zukunft *in-vitro* und *in-vivo* verhalten, bleibt abzuwarten, und ist zur Zeit Gegenstand der Forschung in unserer Arbeitsgruppe.

### 4.7 Modifiziertes Bioreaktorsystem ( Konduits )

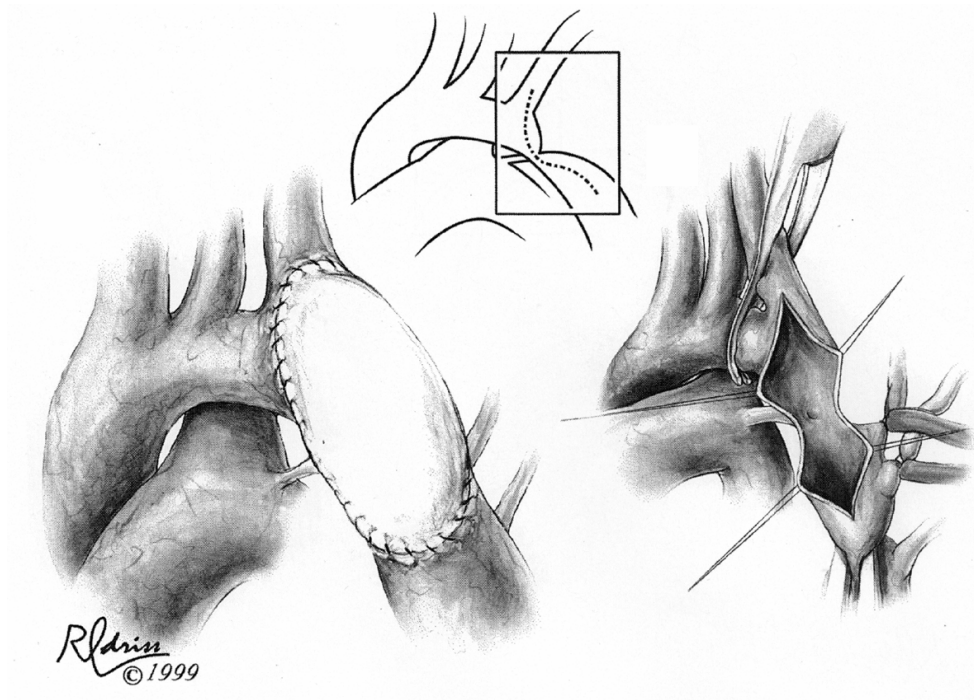
Vor dem Hintergrund der ersten Ergebnisse mit den Bioreaktoren, wurde versucht das Prinzip der dynamischen Zellkonditionierung auf Gefäße und klappentragende Konduits zu übertragen (78, 79, 80, 81). Zum Zeitpunkt des Projektbeginns bestand kein etabliertes Verfahren zur Zellbesiedlung und *in-vitro* Konditionierung von Herzklappen oder klappentragenden Konduits. Aus diesem Mangel heraus haben wir ein komplett neues *in-vitro* Verfahren entwickelt, mit dem es möglich ist, tissue engineerter Herzklappen oder Konduits *in-vitro* herzustellen. Hierbei werden die Polymer-Klappengerüste in der dafür vorgesehenen Kammer eingespannt und zusammen sterilisiert. Anschließend wird die Zellsuspension in die Klappenkammer injiziert und über den Antriebsmechanismus kontinuierlich gedreht. Dadurch wird eine gleichmäßige Verteilung der Zellen als Grundlage für eine kontrollierte Gewebeentwicklung erreicht. Dieses neuartig entwickelte Besiedlungs- und Konditionierungssystem paßt ebenfalls in einen Standardinkubator und kann mit Ethylenoxid sterilisiert werden. Es ist jederzeit einsehbar damit eine kontrollierte Gewebeentwicklung regelmäßig beobachtet werden kann. Die weitere Besonderheit des Systems besteht darin, daß die Polymergerüste unter sterilen Bedingungen besiedelt werden können und anschließend mühelos in das pulsatile Flußsystem integriert werden können, ohne zuvor das neu entstandene Zell-Polymer-Konstrukt einer unsterilen Umgebung auszusetzen.

Somit haben wir ein kombiniertes System für die Zellbesiedlung und Gewebekonditionierung entwickelt, welches unterschiedliche Flußprofile und damit verschiedene physikalische Signale induzieren kann, um eine adäquate extrazelluläre Matrixbildung zu gewährleisten.



#### 4.8 Bioreaktorsystem zur Herstellung eines „Patches“

Im Rahmen der Entwicklungen von speziellen Flußsystemen wurde eine weitere Idee verfolgt, die einen Bioreaktor für sogenannte Patches beschreibt. Die Verwendung von Patches in der Gefäßchirurgie ist eine weit verbreitete Methode zur Therapie von Gefäßdefekten. Speziell in der Therapie von kongenitalen Herz- und Gefäßfehlbildungen findet diese Methode häufig Anwendung (siehe Abbildung 3).



**Abbildung 3)** Verwendung eines Patch bei der operativen Therapie einer Aortenisthmusstenose. Aus: J Card Surg 2000;15:373

Die momentan verwendeten Materialien, die bei der Therapie durch die Implantation von Patches verwendet werden können, haben verschiedene Limitationen (82, 83). Eine Verbesserung auf diesem Gebiet könnte durch die Verwendung von tissue-engineerten Konstrukten erreicht werden. Bisher stand kein Verfahren zur Verfügung, welches die Herstellung eines *in-vitro* konditionierten, autologen Patches mittels Tissue Engineering ermöglicht.

In dieser Arbeit wird ein neues Verfahren zum Tissue Engineering von Patch-Konstrukten beschrieben. Der angesprochene Bioreaktor läßt sich unter Laborbedingungen problemlos bedienen. Eine Sterilisation ist mit Ethylenoxid möglich und kann somit in vielen Kliniken mit herkömmlichen Gerätschaften gewährleistet werden. Durch die Verwendung von P4HB-Gerüstpolymeren und vaskulären Zellen (Schaf) konnten tissue-engnieerte Patch-Konstrukte durch dynamische Konditionierung im Bioreaktor hergestellt werden. Wir konnten zeigen, daß vaskuläre Zellen dem porösen Gerüstpolymer anhafteten und lebende organoide Strukturen bildeten. Dies erfolgte ohne Zeichen einer bakteriellen Kontamination in unserem Patch-Bioreaktor-System. Wir konnten weiter zeigen, dass Zellen von der Oberfläche in das Innere des Patches migrierten und zum Teil komplexe Zell-Polymer-Konstrukte bildeten.

### **4.9 Erste Ergebnisse mit humanen Zellquellen für das „Tissue Engineering“ von kardiovaskulären Geweben**

Nachdem das grundsätzliche Prinzip des „Tissue Engineerings“ im Tierexperiment gezeigt werden konnte, haben wir uns in dieser Untersuchung erstmals mit humanen Zellquellen zur *in-vitro* Herstellung von kardiovaskulärem Gewebe beschäftigt. Bei allen Tissue Engineering Konzepten spielt die ausreichende Bildung von extrazellulären Matrixproteinen und einer adäquaten Zellproliferation eine entscheidende Rolle. In den vorbeschriebenen Experimenten haben sich dynamische Zellkulturbedingungen (Bioreaktoren) als günstiger mechanischer Stimulus für die *in-vitro* Gewebeentwicklung erwiesen. Damit dies funktioniert, ist es wichtig, daß die Zellen zunächst an dem Polymer adherieren und damit beginnen, eine erste extrazelluläre Matrix zu bilden. Um diesen Effekt zu erreichen, wurde bereits von anderen Forschergruppen die Möglichkeit eines chemischen Stimulus mit Wachstumsfaktoren (z.B. FGF, VEGF, TGF usw.) beschrieben (84, 85). Diese Erkenntnisse beruhen teilweise auf Tierexperimenten oder Versuchen mit nicht-vaskulären Zellen. In unserem Versuch lag der Schwerpunkt auf dem chemischen Stimulus für die Zellproliferation und der Ausbildung von humaner, extrazellulärer Matrix innerhalb der Polymergerüste.

## Diskussion

Um die Matrixbildung des humanen Zell-Polymer-Konstruktes anzuregen, wurde dem normalen Zellkulturmedium bei allen Experimenten Vitamin-C (L-ascorbic acid 2-phosphate) beigemischt, da es einen stimulierenden Effekt auf die Kollagen-Synthese hat (86). Zusätzlich wurden zwei weitere Wachstumsfaktoren, nämlich bFGF und TGF, in den Versuchen verwendet.

Beim bFGF (basic fibroblast growth factor) handelt es sich um ein heparinbindendes Polypeptid, welches sowohl von Endothel- als auch von glatten Muskelzellen synthetisiert wird (87). Dieser Wachstumsfaktor erhöht signifikant die Teilungsrate von glatten Muskelzellen und damit die Kollagen-Konzentration des „tissue engineernten“ Konstruktes.

Der zweite verwendete Wachstumsfaktor (TGF, transforming growth factor) ist ebenfalls ein Polypeptid und hat einen großen Einfluß auf die Ausbildung der Gefäßwand. So hat TGF- $\beta$ -1 einen positiven Einfluß auf die Synthese von Fibronektin, Proteoglykan, Kollagen Typ I und Kollagen Typ III in der vaskulären Zellkultur (87).

Aufgrund der zuvor beschriebenen Eigenschaften von bFGF und TGF, wurde in unserem Experiment ihr Einfluß auf pädiatrische, vaskuläre Zellen, welche auf Polymergerüste besiedelt waren, evaluiert. Wir konnten beobachten, daß alle verwendeten Wachstumsfaktoren (bFGF, TGF oder L-ascorbic acid-2-phosphate) einen positiven Effekt auf die Zellproliferation haben. Parallel zur gesteigerten Zellproliferation konnte man in Versuchen, bei denen bFGF dem Zellkulturmedium hinzu gegeben wurde, ebenfalls eine gesteigerte Synthese von Kollagen nachweisen. Hingegen zeigten Zellkulturmedien, die mit TGF vermischt wurden, keine gesteigerte Matrixproduktion, sondern lediglich einen positiven Einfluß auf die Zellproliferation. Den deutlichsten Effekt bezüglich der Zelldichte und extrazellulärer Matrixsynthese fand sich bei einem Zellkulturmedium, dem sowohl bFGF als auch Vitamin-C zugesetzt wurde. Neben den biochemischen Untersuchungen, zeigte sich auch in den histologischen bzw. immunhistologischen Untersuchungen eine fortgeschrittene *in-vitro*-Gewebebildung.

Dieses Erkenntnis war für unsere Arbeit von großer Bedeutung, da sie einerseits zeigte, daß das Konzept des Tissue Engineerings auch auf humane, vaskuläre Zellen angewendet werden kann und andererseits der Gebrauch von Wachstumsfaktoren einen positiven Effekt auf die Ausbildung von humanen Gewebekonstrukten *in-vitro* hat. Diese Publikation stellte somit

## Diskussion

eine wichtige Grundlage für die zukünftige Arbeit mit humanen Zellkulturen und der Herstellung von humanen Herzklappen und Gefäßen dar, die letztendlich in der menschlichen Herzchirurgie angewendet werden sollen.

## 5. Zusammenfassung und Perspektive

Beim Tissue Engineering werden sogenannte Polymergerüste als dreidimensionale Matrix für autologe Zellen verwendet, um einen individuellen und funktionellen Gewebeersatz zu erreichen. Dabei besteht das Hauptziel darin, daß es sich um einen vitalen Gewebeersatz handeln sollte, der sich in das umgebende Gewebe integriert und „normale“ biologische Fähigkeiten besitzt wie z.B. mitzuwachsen und sich zu regenerieren. Dieser Gewebeersatz wird außerhalb des menschlichen Körpers (*in-vitro*) hergestellt und sollte zu einem späteren Zeitpunkt beim gleichen Patienten implantiert werden, von dem ursprünglich die Zellen entnommen wurden.

Heutzutage werden weltweit hauptsächlich künstliche Prothesen implantiert, um geschädigte Herzklappen und Gefäße zu ersetzen. Wie bereits erwähnt, haben all diese Prothesen gemeinsam, daß sie aus körperfremdem Material bestehen, welche nicht mitwachsen und nach einiger Zeit degenerieren und somit wiederum ausgetauscht werden müssen. Eine sogenannte tissue engineerte Prothese hätte theoretisch diesen Nachteil nicht und würde sich nach der Implantation in das umliegende Gewebe integrieren und dauerhaft erhalten bleiben. In Kooperation mit den Arbeitsgruppen von Joseph P. Vacanti MD (Massachusetts General Hospital, Harvard Medical School), John E. Mayer jr. MD (Children's Hospital Boston, Harvard Medical School) und meiner Arbeitsgruppe für Tissue Engineering am Deutschen Herzzentrum Berlin haben wir uns daher intensiv mit dem Tissue Engineering von Herzklappen und Gefäßen beschäftigt. Im Mittelpunkt stand die Entwicklung, *in-vitro*-Herstellung und *in-vivo*-Testung einer dreiseiligen, „tissue engineerten“ Herzklappe. Aufbauend auf diesen Ergebnissen habe ich mich mit dem optimierten Design von Herzklappengerüsten beschäftigt und weitgehend zuverlässige *in-vitro*-Methoden entwickelt, um reproduzierbar tissue engineerte Konstrukte (Herzklappen, klappentragende Konduits, Gefäße und Patches) herzustellen. Weiterhin haben wir damit begonnen, humane Zellquellen zu evaluieren und für das „Tissue Engineering“ von kardiovaskulären Geweben zu nutzen.

Das Hauptziel für die Zukunft besteht ganz klar darin, vitale, autologe Gewebekonstrukte für die menschliche Herzchirurgie herzustellen. In den letzten sieben Jahren wurden aufgrund der guten interdisziplinären Zusammenarbeit von Biologen, Chemikern, Physikern, Ingenieuren und Chirurgen enorme Fortschritte auf diesem Forschungsgebiet erreicht.

Um die zukünftige, routinemäßige Anwendung dieser „tissue engineerten“ Konstrukte in der Herzchirurgie wahrscheinlicher zu machen, liegt ein Schwerpunkt unserer Arbeit darin, in-vitro-Systeme für die Herstellung von kardiovaskulären Geweben weiterzuentwickeln und auf der Basis von humanen Zellquellen autologes Gewebe herzustellen. Trotz der ersten ermutigenden Ergebnissen muß diese Methode weiterhin modifiziert und perfektioniert werden, bevor ein solches Konstrukt zuverlässig in der Herzchirurgie angewendet werden kann.

## 6. Terminologie

Die Begriffe „Tissue Engineering“, „Polymer“ und „Bioreaktor“ tauchen immer wieder in der Arbeit auf und sind daher in diesem Teil nochmals kurz erläutert.

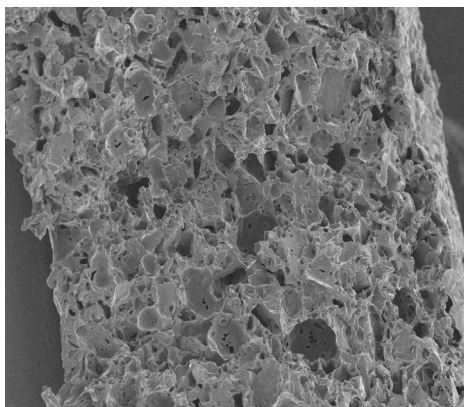
### 6.1 Tissue Engineering

Beim Tissue Engineering wird grundsätzlich versucht, biologische Ersatzgewebe herzustellen. Das Konzept besteht darin, aus körpereigenen Zellen einen vitalen und funktionalen Gewebeersatz zu fertigen. Hierbei werden körpereigene Zellen auf ein Gerüst transplantiert, *in-vitro* zu einer stabilen Struktur gefestigt, um letztendlich ein vitales Ersatzgewebe implantieren zu können. Die so hergestellten Konstrukte sollten in das umgebende Gewebe einwachsen und haben theoretisch das Potential sich wie gesundes Gewebe zu entwickeln (84, 85).

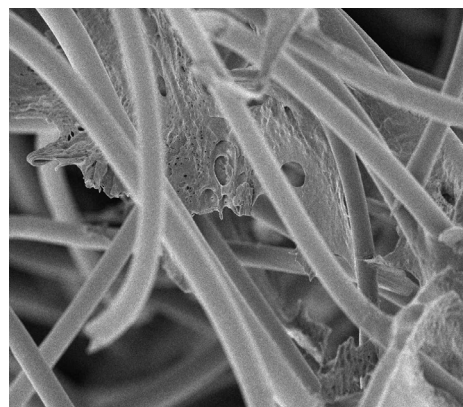
### 6.2 Polymere

In unseren Projekten konzentrierten wir uns auf drei verschiedene Polymere: PHA, P4HB und ein Co-Polymer aus PGA und P4HB, welches in unserem Labor hergestellt wurde. Diese Polymere weisen einige Besonderheiten auf, welche die Grundlagen der zuvor beschriebenen und zukünftigen Arbeiten sind (86, 87, 88). Abbildung 4 zeigt drei elektronenmikroskopische Aufnahmen der Polymere.

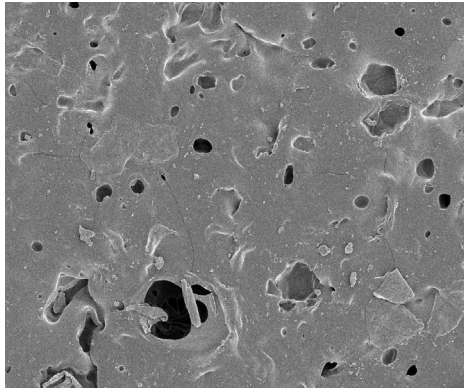
4a) P4HB



4b) PGA/P4HB



### 4c) PHA



In verschiedenen Vorversuchen hat sich gezeigt, daß die Zellen zwar auf dem Polymer anheften können, jedoch aufgrund einer durch den Fabrikationsprozess (P4HB) bedingten glatten Oberfläche nicht in das Polymer einwachsen und damit bei höheren Flüssen abgelöst werden. Aufgrund unserer Erfahrungen mit Polymeren haben wir folgende Strategien zur Lösung des Problems verfolgt:

- mechanisches Aufrauen
- Vorbeschichtung
- Wachstumsfaktoren

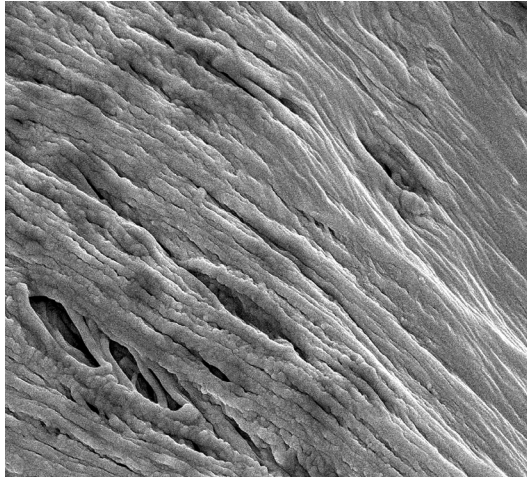
Neben der mechanischen Bearbeitung der Polymeroberfläche, wurden verschiedene Matrixproteine (Kollagen Typ I, Laminin, Fibronectin) sowie fetales Kälberserum als Beschichtungsmaterial im Vergleich zu unbeschichtetem P4HB verwendet. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Zellen, z.B. Myofibroblasten (vom Schaf als auch vom Menschen), einen festen Kontakt mit dem Polymer nur dann herstellen können, wenn eine geeignete Vorbeschichtung vorliegt. Die zur Beschichtung von P4HB verwendeten extrazellulären Matrixproteine sowie das fetale Kälberserum fördern scheinbar die Proliferation der adherierten Zellen, die anschliessend in der Lage sind, in das Polymer einzuwandern und ihre eigene Matrix zu bilden. Im Gegensatz zu den beschichteten P4HB-Patches adherierten Zellen auf unbeschichtetem P4HB schlecht. Ein früher Zelltod trat ein, da keine Proliferation der Zellen sowie keine Ausbildung von extrazellulären Matrixproteinen stattfand. Besonders gute Ergebnisse in der Adhäsion und Proliferation der Zellen erzielten Beschichtungen mit fetalem



## Terminologie

Kälberserum und Laminin. Die Zellen wanderten verstärkt in das Polymer ein und bildeten dort ihre eigene Matrix.

5a) ESEM-Aufnahme



5b) HE-Färbung



## 6.3 Bioreaktor

Mit Bioreaktoren sollen *in-vitro*-Bedingungen geschaffen werden, um mit Zellen besiedelte Gerüste zu vitalem, dreidimensionalen Gewebe heranreifen zu lassen. In diesen Systemen werden *in-vivo*-Bedingungen künstlich nachgeahmt und die Konstrukte werden mit Sauerstoff, Wachstumsfaktoren, Zellkulturmedium versorgt und parallel biomechanischen Belastungen (Fluß, Druck, Dehnung und Kompression) ausgesetzt, welche die Gewebebildung fördern (89, 90, 91).

## Literaturverzeichnis

1. Lanza RP, Langer R, Vacanti JP. Principles of Tissue Engineering, Second Edition.
2. Vacanti CA, Vacanti JP. History and Scope of Tissue Engineering; Lanza RP, Langer R, Vacanti JP; Principles of Tissue Engineering, Second Edition.
3. Hume DM, Merrill JP, Miller BF, Thorn GW. Experiences with renal homotransplantation in the human: report of nine cases. J Clin Invest. 1955 Feb;34(2):327-82.
4. Starzl TE, Marchioro TL, Huntley RT, Rifkind D, Rowlands DT Jr, Dickinson TC, Waddell WR. EXPERIMENTAL AND CLINICAL HOMOTRANSPLANTATION OF THE LIVER. Ann N Y Acad Sci. 1964 Nov 30;120:739-65.
5. Dong E Jr, Lower RR, Hurley EJ, Shumway NE. Transplantation of the heart. Dis Chest. 1965 Nov;48(5):455-7.
6. Hetzer R, Loebe M, Potapov EV, Weng Y, Stiller B, Hennig E, Alexi-Meskishvili V, Lange PE. Circulatory support with pneumatic paracorporeal ventricular assist device in infants and children. Ann Thorac Surg. 1998 Nov;66(5):1498-506.
7. Penn I. Occurrence of cancers in immunosuppressed organ transplant recipients. Clin Transpl. 1998;;147-58.
8. Edwards LB, Keck BM. Thoracic organ transplantation in the US. Clin Transpl. 2002;;29-40.
9. Williams WG, McCrindle BW, Ashburn DA, Jonas RA, Mavroudis C, Blackstone EH; Congenital Heart Surgeon's Society. Outcomes of 829 neonates with complete transposition of the great arteries 12-17 years after repair. Eur J Cardiothorac Surg. 2003 Jul;24(1):1-9; discussion 9-10.
10. Sullivan JM, Harken DE, Gorlin R. Pharmacologic control of thromboembolic complications of cardiac-valve replacement. A preliminary report. N Engl J Med. 1968 Sep 12;279(11):576-80.
11. Cannegieter SC, Rosendaal FR, Briet E. Thromboembolic and bleeding complications in patients with mechanical heart valve prostheses. Circulation. 1994 Feb;89(2):635-41.
12. Hammermeister K, Sethi GK, Henderson WG, Grover FL, Oprian C, Rahimtoola SH. Outcomes 15 years after valve replacement with a mechanical versus a bioprosthetic valve: final report of the Veterans Affairs. A randomized trial. J Am Coll Cardiol. 2000 Oct;36(4):1152-8.

13. Yankah AC, Alexi-Meskishvili V, Weng Y, Berger F, Lange P, Hetzer R. Performance of aortic and pulmonary homografts in the right ventricular outflow tract in children. *J Heart Valve Dis.* 1995 Jul;4(4):392-5.
14. Brown JW, Ruzmetov M, Vijay P, Rodefeld MD, Turrentine MW. Surgery for aortic stenosis in children: a 40-year experience. *Ann Thorac Surg.* 2003 Nov;76(5):1398-411.
15. Erez E, Kanter KR, Isom E, Williams WH, Tam VK. Mitral valve replacement in children. *J Heart Valve Dis.* 2003 Jan;12(1):25-9; discussion 30.
16. Raghuveer G, Caldarone CA, Hills CB, Atkins DL, Belmont JM, Moller JH. Predictors of prosthesis survival, growth, and functional status following mechanical mitral valve replacement in children aged <5 years, a multi-institutional study. *Circulation.* 2003 Sep 9;108 Suppl 1:II174-9.
17. Riles TS. Presidential address: the next quarter. *J Vasc Surg.* 2004 Feb;39(2):275-8.
18. Dieval F, Chakfe N, Wang L, Riepe G, Thaveau F, Heintz C, Mathieu D, Le Magnen JF, Kretz JG, Durand B; European Group for Research into Vascular Grafts. Mechanisms of rupture of knitted polyester vascular prostheses: an in vitro analysis of virgin prostheses. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2003 Oct;26(4):429-36.
19. Haruguchi H, Teraoka S. Intimal hyperplasia and hemodynamic factors in arterial bypass and arteriovenous grafts: a review. *J Artif Organs.* 2003;6(4):227-35. Review.
20. Kadoba K, Schoen FJ, Jonas RA. Experimental comparison of albumin-sealed and gelatin-sealed knitted Dacron conduits. Porosity control, handling, sealant resorption, and healing. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1992 Jun;103(6):1059-67.
21. Langer RS, Vacanti JP. Tissue engineering: the challenges ahead. *Sci Am.* 1999 Apr;280(4):86-9.
22. Vacanti CA, Vacanti JP. The science of tissue engineering. *Orthop Clin North Am.* 2000 Jul;31(3):351-6.
23. Vacanti JP. Tissue and organ engineering: can we build intestine and vital organs? *J Gastrointest Surg.* 2003 Nov;7(7):831-5.
24. Nerem RM. The challenge of imitating nature; Lanza RP, Langer R. Vacanti JP; Principles of Tissue Engineering, Second Edition.
25. Matas AJ, Sutherland DE, Steffes MW, Simmons RL, Najarian JS. Hepatocellular transplantation in UDP-glucuronyl-transferase-deficient rats. *Surg Forum.* 1975;26:428-31.

26. Sullivan SJ, Lanza RP, Maki T, Borland KM, Lodge JP, Staruk JE, Muller TE, Monaco AP, Solomon BA, Chick W. Islet transplantation using an immunoprotective membrane in dogs that have undergone a pancreatectomy. *ASAIO J.* 1992 Jul-Sep;38(3):M450-3.
27. Gerlach JC, Mutig K, Sauer IM, Schrade P, Efimova E, Mieder T, Naumann G, Grunwald A, Pless G, Mas A, Bachmann S, Neuhaus P, Zeilinger K. Use of primary human liver cells originating from discarded grafts in a bioreactor for liver support therapy and the prospects of culturing adult liver stem cells in bioreactors: a morphologic study. *Transplantation.* 2003 Sep 15;76(5):781-6.
28. Jaeger CB, Greene LA, Tresco PA, Winn SR, Aebischer P. Polymer encapsulated dopaminergic cell lines as "alternative neural grafts". *Prog Brain Res.* 1990;82:41-6.
29. Monaco AP, Maki T, Ozato H, Carretta M, Sullivan SJ, Borland KM, Mahoney MD, Chick WL, Muller TE, Wolfrum J et al. Transplantation of islet allografts and xenografts in totally pancreatectomized diabetic dogs using the hybrid artificial pancreas. *Ann Surg.* 1991 Sep;214(3):339-60; discussion 361-2.
30. Shieh SJ, Terada S, Vacanti JP. Tissue engineering auricular reconstruction: in vitro and in vivo studies. *Biomaterials.* 2004 Apr;25(9):1545-57.
31. Gardner-Thorpe J, Grikscheit TC, Ito H, Perez A, Ashley SW, Vacanti JP, Whang EE. Angiogenesis in tissue-engineered small intestine. *Tissue Eng.* 2003 Dec;9(6):1255-61.
32. Zund G, Breuer CK, Shinoka T, Ma PX, Langer R, Mayer JE, Vacanti JP. The in vitro construction of a tissue engineered bioprosthetic heart valve. *Eur J Cardiothorac Surg.* 1997 Mar;11(3):493-7.
33. Shinoka T, Ma PX, Shum-Tim D, Breuer CK, Cusick RA, Zund G, Langer R, Vacanti JP, Mayer JE Jr. Tissue-engineered heart valves. Autologous valve leaflet replacement study in a lamb model. *Circulation.* 1996 Nov 1;94(9 Suppl):II164-8.
34. Kaushal S, Amiel GE, Guleserian KJ, Shapira OM, Perry T, Sutherland FW, Rabkin E, Moran AM, Schoen FJ, Atala A, Soker S, Bischoff J, Mayer JE Jr. Functional small-diameter neovessels created using endothelial progenitor cells expanded ex vivo. *Nat Med.* 2001 Sep;7(9):1035-40.
35. Lovell MJ, Mathur A. The role of stem cells for treatment of cardiovascular disease. *Cell Prolif.* 2004 Feb;37(1):67-87.
36. Waksman R, Baffour R. Bone marrow and bone marrow derived mononuclear stem cells therapy for the chronically ischemic myocardium. *Cardiovasc Radiat Med.* 2003 Jul-Sep;4(3):164-8.

37. Rabkin E, Schoen FJ. Cardiovascular tissue engineering. *Cardiovasc Pathol*. 2002 Nov-Dec;11(6):305-17.
38. van Bilsen PH, Popa ER, Brouwer LA, Vincent J, Taylor CE, de Leij LF, Hendriks M, van Luyn MJ. Ongoing foreign body reaction to subcutaneous implanted (heparin) modified Dacron in rats. *J Biomed Mater Res*. 2004 Mar 1;68A(3):423-7.
39. Trubel W, Schima H, Czerny M, Perktold K, Schimek MG, Polterauer P. Experimental comparison of four methods of end-to-side anastomosis with expanded polytetrafluoroethylene. *Br J Surg*. 2004 Feb;91(2):159-67.
40. Veiseh M, Wickes BT, Castner DG, Zhang M. Guided cell patterning on gold-silicon dioxide substrates by surface molecular engineering. *Biomaterials*. 2004 Jul;25(16):3315-24.
41. Williams SF, Martin DP, Horowitz DM, Peoples OP. PHA applications: addressing the price performance issue: I. Tissue engineering. *Int J Biol Macromol*. 1999 Jun-Jul;25(1-3):111-21.
42. Marlovits S, Tichy B, Truppe M, Gruber D, Vecsei V. Chondrogenesis of aged human articular cartilage in a scaffold-free bioreactor. *Tissue Eng*. 2003 Dec;9(6):1215-26.
43. Meinel L, Karageorgiou V, Fajardo R, Snyder B, Shinde-Patil V, Zichner L, Kaplan D, Langer R, Vunjak-Novakovic G. Bone tissue engineering using human mesenchymal stem cells: effects of scaffold material and medium flow. *Ann Biomed Eng*. 2004 Jan;32(1):112-22.
44. Christensen R, Jensen UB, Jensen TG. Skin genetically engineered as a bioreactor or a 'metabolic sink'. *Cells Tissues Organs*. 2002;172(2):96-104.
45. Shinoka T, Breuer CK, Tanel RE, Zund G, Miura T, Ma PX, Langer R, Vacanti JP, Mayer JE Jr. Tissue engineering heart valves: valve leaflet replacement study in a lamb model. *Ann Thorac Surg*. 1995 Dec;60(6 Suppl):S513-6.
46. Bader A, Schilling T, Teebken OE, Brandes G, Herden T, Steinhoff G, Haverich A. Tissue engineering of heart valves--human endothelial cell seeding of detergent acellularized porcine valves. *Eur J Cardiothorac Surg*. 1998 Sep;14(3):279-84.
47. Simon P, Kasimir MT, Seebacher G, Weigel G, Ullrich R, Salzer-Muhar U, Rieder E, Wolner E. Early failure of the tissue engineered porcine heart valve SYNERGRAFT in pediatric patients. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2003 Jun;23(6):1002-6; discussion 1006.
48. Weinberg CB, Bell E. A blood vessel model constructed from collagen and cultured vascular cells. *Science*. 1986 Jan 24;231(4736):397-400.

49. L'Heureux N, Stoclet JC, Auger FA, Lagaud GJ, Germain L, Andriantsitohaina R. A human tissue-engineered vascular media: a new model for pharmacological studies of contractile responses. *FASEB J*. 2001 Feb;15(2):515-24.
50. Niklason LE, Gao J, Abbott WM, Hirschi KK, Houser S, Marini R, Langer R. Functional arteries grown in vitro. *Science*. 1999 Apr 16;284(5413):489-93.
51. Shin'oka T, Imai Y, Ikada Y. Transplantation of a tissue engineered pulmonary artery. *N Engl J Med* 2001;344:532-33.
52. Laube HR, Duwe J, Rutsch W, Konertz W. Clinical experience with autologous endothelial cell-seeded polytetrafluoroethylene coronary artery bypass grafts. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2000 Jul;120(1):134-41.
53. Papadaki M, Bursac N, Langer R, Merok J, Vunjak-Novakovic G, Freed LE. Tissue engineering of functional cardiac muscle: molecular, structural, and electrophysiological study. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2001 Jan;280(1):H168-78.
54. Menasche P. Myoblast-based cell transplantation. *Heart Fail Rev*. 2003 Jul;8(3):221-7.
55. Stamm C, Westphal B, Kleine HD, Petzsch M, Kittner C, Klinge H, Schumichen C, Nienaber CA, Freund M, Steinhoff G. Autologous bone-marrow stem-cell transplantation for myocardial regeneration. *Lancet*. 2003 Jan 4;361(9351):45-6.
56. Brenner W, Aicher A, Eckey T, Massoudi S, Zuhayra M, Koehl U, Heeschen C, Kampen WU, Zeiher AM, Dimmeler S, Henze E. <sup>111</sup>In-Labeled CD34+ Hematopoietic Progenitor Cells in a Rat Myocardial Infarction Model. *J Nucl Med*. 2004 Mar;45(3):512-518.
57. Niklason LE, Langer RS. Advances in tissue engineering of blood vessels and other tissues. *Transpl Immunol*. 1997 Dec;5(4):303-6.
58. Cancedda R, De Luca M. Tissue engineering for clinical application. *Year Immunol*. 1993;7:193-8. Review.
59. Williams SF, Peoples OP. Biodegradable plastics from plants. *Chemtech* 26: 38-44,1996.
60. Stock UA, Nagashima M, Khalil PN, Nollert GD, Herden T, Sperling JS, Moran A, Lien J, Martin DP, Schoen FJ, Vacanti, JP, Mayer JE Jr. Tissue-engineered valved conduits in the pulmonary circulation. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2000 Apr;119(4 Pt 1):732-40.
61. Zund G, Breuer CK, Shinoka T, Ma PX, Langer R, Mayer JE, Vacanti JP. The in vitro construction of a tissue engineered bioprosthetic heart valves. *Eur J Cardiothorac Surg*. 1997 Mar;11(3):493-7.

62. Mitsumata M, Fishel RS, Nerem RM, Alexander RW, Berk BC. Fluid shear stress stimulates platelet-derived growth factor expression in endothelial cells. *Am J Physiol.* 1993 Jul;265(1 Pt 2):H3-8.
63. Kanda K, Matsuda T. Mechanical stress-induced orientation and ultrastructural change of smooth muscle cells cultured in three-dimensional collagen lattices. *Cell Transplant.* 1994 Nov-Dec;3(6):481-92.
64. Benbrahim A, L'Italien GJ, Milinazzo BB, Warnock DF, Dhara S, Gertler JP, Orkin RW, Abbott WM. A compliant tubular device to study the influences of wall strain and fluid shear stress on cells of the vascular wall. *J Vasc Surg.* 1994 Aug;20(2):184-94.
65. Ye Q, Zund G, Jockenhoevel S, Hoerstrup SP, Schoeberlein A, Grunenfelder J, Turina M. Tissue engineering in cardiovascular surgery: new approach to develop completely human autologous tissue. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2000 Apr;17(4):449-54.
66. Hoerstrup SP, Zund G, Sodian R, Schnell AM, Grunenfelder J, Turina MI. Tissue engineering of small caliber vascular grafts. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2001 Jul;20(1):164-9.
67. Hoerstrup SP, Kadner A, Melnitchouk S, Trojan A, Eid K, Tracy J, Sodian R, Visjager JF, Kolb SA, Grunenfelder J, Zund G, Turina MI. Tissue engineering of functional trileaflet heart valves from human marrow stromal cells. *Circulation.* 2002 Sep 24;106(12 Suppl 1):I143-50.
68. Hoerstrup SP, Kadner A, Breymann C, Maurus CF, Guenter CI, Sodian R, Visjager JF, Zund G, Turina MI. Living, autologous pulmonary artery conduits tissue engineered from human umbilical cord cells. *Ann Thorac Surg.* 2002 Jul;74(1):46-52; discussion 52.
69. Hoerstrup SP, Zund G, Cheng S, Melnitchouk S, Kadner A, Sodian R, Kolb SA, Turina M. A new approach to completely autologous cardiovascular tissue in humans. *ASAIO J.* 2002 May-Jun;48(3):234-8.
70. Niklason LE. Techview: medical technology. Replacement arteries made to order. *Science.* 1999 Nov 19;286(5444):1493-4.
71. Stock UA, Mayer JE Jr. Tissue engineering of cardiac valves on the basis of PGA/PLA Co-polymers. *J Long Term Eff Med Implants.* 2001;11(3-4):249-60.
72. Mayer JE Jr, Shin'oka T, Shum-Tim D. Tissue engineering of cardiovascular structures. *Curr Opin Cardiol.* 1997 Nov;12(6):528-32.
73. Nugent HM, Edelman ER. Tissue engineering therapy for cardiovascular disease. *Circ Res.* 2003 May 30;92(10):1068-78. Review.

74. Mitchell SL, Niklason LE. Requirements for growing tissue-engineered vascular grafts. *Cardiovasc Pathol*. 2003 Mar-Apr;12(2):59-64.
75. Teebken OE, Puschmann C, Aper T, Haverich A, Mertsching H. Tissue-engineered bioprosthetic venous valve: a long-term study in sheep. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2003 Apr;25(4):305-12.
76. Thubrikar MJ, Nolan SP, Aouad J, Deck JD. Stress sharing between the sinus and leaflets of canine aortic valve. *Ann Thorac Surg*. 1986 Oct;42(4):434-40.
77. Brutel de la Riviere A, Quaegebeur JM, Hennis PJ, Bruteil de la Riviere G, Huysmans HA, Brom AG. Growth of an aorta-coronary anastomosis. An experimental study in pigs. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1983 Sep;86(3):393-9.
78. Kofidis T, Lenz A, Boublik J, Akhyari P, Wachsmann B, Mueller-Stahl K, Hofmann M, Haverich A. Pulsatile perfusion and cardiomyocyte viability in a solid three-dimensional matrix. *Biomaterials*. 2003 Dec;24(27):5009-14.
79. Ochoa ER, Vacanti JP. An overview of the pathology and approaches to tissue engineering. *Ann N Y Acad Sci*. 2002 Dec;979:10-26; discussion 35-8. Review.
80. Mol A, Bouten CV, Zund G, Gunter CI, Visjager JF, Turina MI, Baaijens FP, Hoerstrup SP. The relevance of large strains in functional tissue engineering of heart valves. *Thorac Cardiovasc Surg*. 2003 Apr;51(2):78-83.
81. Barron V, Lyons E, Stenson-Cox C, McHugh PE, Pandit A. Bioreactors for cardiovascular cell and tissue growth: a review. *Ann Biomed Eng*. 2003 Oct;31(9):1017-30. Review.
82. Heikkinen LO, Jarvinen AA. Aortopulmonary fistula after coarctation repair with Dacron patch aortoplasty. *Ann Thorac Surg*. 2002 May;73(5):1634-6.
83. Stamm C, Kreutzer C, Zurakowski D, Nollert G, Friehs I, Mayer JE, Jonas RA, del Nido PJ. Forty-one years of surgical experience with congenital supra-ventricular aortic stenosis. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1999 Nov;118(5):874-85.
84. Vacanti JP, Langer R. Tissue engineering: the design and fabrication of living replacement devices for surgical reconstruction and transplantation. *Lancet*. 1999 Jul;354 Suppl 1:SI32-4.
85. Langer RS, Vacanti JP. Tissue engineering: the challenges ahead. *Sci Am*. 1999 Apr;280(4):86-9.
86. Zisch AH, Lutolf MP, Hubbell JA. Biopolymeric delivery matrices for angiogenic growth factors. *Cardiovasc Pathol*. 2003 Nov-Dec;12(6):295-310.



87. Dvorin EL, Wylie-Sears J, Kaushal S, Martin DP, Bischoff J. Quantitative evaluation of endothelial progenitors and cardiac valve endothelial cells: proliferation and differentiation on poly-glycolic acid/poly-4-hydroxybutyrate scaffold in response to vascular endothelial growth factor and transforming growth factor beta1. *Tissue Eng.* 2003 Jun;9(3):487-93.
88. Sutherland FW, Perry TE, Nasser BA, Wang J, Kaushal S, Guleserian KJ, Martin DP, Vacant JP, Mayer JE Jr. Advances in the mechanisms of cell delivery to cardiovascular scaffolds: comparison of two rotating cell culture systems. *ASAIO J.* 2002 Jul-Aug;48(4):346-9.
89. Martin I, Wendt D, Heberer M. The role of bioreactors in tissue engineering. *Trends Biotechnol.* 2004 Feb;22(2):80-6.
90. Langer R. Tissue engineering. *Mol Ther.* 2000 Jan;1(1):12-5.
91. Agrawal CM, McKinney JS, Lancot D, Athanasiou KA. Effects of fluid flow on the in vitro degradation kinetics of biodegradable scaffolds for tissue engineering. *Biomaterials.* 2000 Dec;21(23):2443-52.

## Abkürzungsverzeichnis

<b>bFGF</b>	basic fibroblast growth factor
<b>CT</b>	computer tomography
<b>DMEM</b>	Dulbecco's modified eagle's medium
<b>ePTFE</b>	expanded Polytetrafluoroethylen
<b>ESEM</b>	enviromental scanning electron microscopy
<b>FBS</b>	fetal bovine serum
<b>GAG</b>	glycosaminoglycan
<b>GPC</b>	gas phase chromatography
<b>HE</b>	hematoxylin eosin staining
<b>I.D.</b>	inner diameter
<b>MPAP</b>	main pulmonary artery pressure
<b>MW</b>	molecular weight
<b>NIH</b>	National Institute of Health
<b>P4HB</b>	poly-4-hydroxybutyrate
<b>PGA</b>	polyglycolic acid
<b>PHA</b>	polyhydroxyalkanoate
<b>PHOH</b>	poly-3-hydroxyoctanoate-co-hydroxyhexanoate
<b>PLA</b>	poly lactic acid
<b>PVE</b>	prosthetic valve endocarditis
<b>PVR</b>	pulmonary valve replacement
<b>RVOTP</b>	right ventricular outflow tract pressure
<b>SMA</b>	smooth muscle actin
<b>STL</b>	stereolithography
<b>STLV</b>	slow turning lateral vessel
<b>TE</b>	Tissue Engineering
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	transforming growth factor
<b>T<sub>m</sub></b>	melting temperature
<b>USD</b>	US-Dollar
<b>vWF</b>	von Willebrand factor

## **Tierversuchsgenehmigungen / Ethikanträge**

Grundlage für die tierexperimentellen Arbeiten am Children's Hospital Boston (Harvard Medical School) waren die Genehmigungen der lokalen Behörden von J.P. Vacanti MD (John Homans Professor of Surgery) und J.E. Mayer jr. MD (Professor of Surgery).

Für die Versuche, die ich in Berlin durchgeführt habe galt die Bewilligung der Ethik-Kommission der Medizinischen Fakultät der Humboldt-Universität zu Berlin (Antragsnummer: 170/01 und 186/01).

## Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. **Dr. med. Dr. hc mult. R. Hetzer**, Ärztlicher Direktor des Deutschen Herzzentrum Berlin, für seine stets großzügige Unterstützung meiner klinischen und wissenschaftlichen Tätigkeit. Es war seine Idee sich mit dem Thema „Tissue Engineering“ zu beschäftigen und es ist sein Verdienst, daß dieses Thema kontinuierlich gefördert wurde.

Zu großem Dank bin ich auch Herrn **Professor JP Vacanti** (Harvard Medical School, Boston) und Herrn **Professor John E. Mayer jr.** (Harvard Medical School, Boston) verpflichtet, die mir während meiner wissenschaftlichen Tätigkeit am Children's Hospital Boston (Harvard Medical School) immer beratend, motivierend und freundschaftlich zur Seite standen.

Ebenfalls bedanke ich mich bei Herrn **Priv. Doz. Dr. med M. Loebe**, der mich immer in freundschaftlicher Weise und mit viel Humor motiviert hat wissenschaftlich zu arbeiten.

Weiterhin gilt mein großer Dank den Herrn **Priv. Doz. Dr. med. H. Hausmann**, **Dr. med. S. Mulahasanovic** und **Dr. med. R. Hammerschmidt**, die sich bisher größtenteils mein chirurgischen Ausbildung angenommen haben.

Bedanken möchte ich mich ebenfalls für die großzügige Unterstützung der **Freunde und Förderer des Deutschen Herzzentrums e.V.** und der **Deutschen Forschungsgemeinschaft** für den Forschungsaufenthalt im Ausland und der Durchführung der wissenschaftlichen Experimente.

Weiterhin danke ich den Mitarbeitern unserer Arbeitsgruppe Frau **Dr. rer. nat. C. Lüders**, **Dr. Ping Fu** und den medizinischen Doktoranden **Thees Lemke** und **Liv Krämer**, für die nette und innovative Zusammenarbeit.

Außerdem bedanke ich mich bei allen Kooperationspartner vor allem **Herrn PD Dr. med. Simon P. Hoerstrup** (Universitätsspital Zürich), Herrn **Dr. David Martin** (Tepha Inc.), **Dr. Simon Williams** (Tepha Inc.), **Prof. Dr. R. Meyer** (Deutsches Herzzentrum Berlin),

## Danksagung

**Frederick J. Schoen**, MD,PhD (Brigham and Women's Hospital, Harvard Medical School Boston), **Dr. Norbert Franz** (Deutsches Herzzentrum Berlin), **Barbara Barth** (Deutsches Herzzentrum Berlin) **Annette Gaußmann** (Graphik), **Carla Weber** (Graphik), **Astrid Benhennour** (Bibliothek) und **Anne Gale** (Lektorin), die alle einen großen Beitrag am gesamten „Tissue-Engineering-Projekt“ geleistet haben.

## **EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG**

gemäß Habilitationsordnung der Medizinischen Fakultät Charité

Hiermit erkläre ich, daß

- keine staatsanwaltschaftlichen Ermittlungsverfahren gegen mich anhängig sind,
- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde bzw. welchen Ausgang ein durchgeführtes Habilitationsverfahren hatte;
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfaßt, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen wurden, sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlerinnen oder Wissenschaftlern und technischen Hilfskräften und die Literatur vollständig angegeben sind,
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

.....  
Datum

.....  
Unterschrift